



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
Ano 2009

**Cátia Inês Rodrigues
dos Santos**

**Avaliação do extracto aquoso de *Inula crithmoides*
em ratinhos expostos a CCl₄**



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
Ano 2009

**Cátia Inês Rodrigues
dos Santos**

**Avaliação do extracto aquoso de *Inula crithmoides*
em ratinhos expostos a CCl₄**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Toxicologia e Ecotoxicologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, e Professora Doutora Helena Silva, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Professor Doutor António José Arsénia Nogueira

professor associado com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Professor Doutor Bruno André Fernandes de Jesus da Silva Nunes

professor associado da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa

Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira

professora associada com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Helena Abreu Silva

professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Agradeço primeiramente à Professora Doutora Maria de Lourdes, minha orientadora, por me ter proporcionado realizar esta tese numa área que sempre me cativou e também pela autonomia ao longo do trabalho.

À Professora Doutora Helena Silva, co-orientadora, agradeço pela disponibilidade e prontidão na resolução dos problemas que foram surgindo ao longo deste trabalho.

Ao Professor Bruno Nunes, agradeço o tempo, disponibilidade e boa disposição.

Ao Professor António Nogueira agradeço a ajuda no tratamento estatístico dos dados.

Ao Dr. Américo Freitas, da clínica de análises clínicas (AVELAB), agradeço a receptividade, colaboração e análise dos parâmetros séricos dos animais.

Aos Professores Ana Rodrigues, Amadeu Soares, Marina Cunha e Sónia Mendo agradeço pela disponibilização dos recursos materiais, nomeadamente o liofilizador, espectrofotómetro, excicador e arca a -80°C.

Queria agradecer aos meus colegas de laboratório: Sara Rodrigues, Sónia Oliveira, Ricardo, Vera e Filipa pela cooperação neste trabalho e ainda à Laetitia Teixeira pela ajuda.

palavras-chave

Inula crithmoides; hepatoprotecção; hepatoregeneração; CCl₄; enzimas antioxidantes; histologia

resumo

O presente estudo teve como objectivo avaliar os efeitos hepatoprotectores e hepatoregeneradores do extracto aquoso das porções aéreas de *Inula crithmoides* L. (250 mg/Kg) em ratinhos expostos a CCl₄. Foram colhidas amostras de sangue para determinar os parâmetros bioquímicos séricos (ALT e AST). O fígado e rins de todos os grupos de animais foram extraídos para avaliar as actividades das enzimas antioxidantes: catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GSTs) e a glutathione peroxidase (GPx) total e selénio dependente. As lesões histopatológicas foram analisadas no fígado, rim e baço. Os valores das transaminases séricas (ALT e AST) do grupo tratado com o extracto aquoso de *I. crithmoides* mostraram ser similares aos do grupo controlo o que demonstra que o extracto aquoso não parece ser tóxico. A análise dos cortes histológicos revelou infiltrados inflamatórios, focos hemorrágicos, esteatose e necrose centrolobular nos ratinhos expostos ao CCl₄ e revelou a regeneração nos órgãos de ratinhos administrados com CCl₄ e extracto de *I. crithmoides*. A restauração dos níveis das enzimas antioxidantes (CAT, GSTs e GPx) não revelou ser coerente. Por esta razão não foi possível concluir quanto à propriedade antioxidante do extracto. Os resultados do presente estudo sugerem que o extracto aquoso de *I. crithmoides* (250 mg/Kg) não revela efeito hepatoprotector na dose administrada, no entanto, poderá possuir efeitos hepatoregeneradores.

keywords

Inula crithmoides; hepatoprotective effect; hepatoregenerative effect ; CCl₄; antioxidant enzymes; histology

Abstract

The present study was carried out to observe the hepatoprotective and hepatoregenerative effects of the aqueous extract of the aeral parts of *Inula crithmoides* Linn. (250mg/kg) in mice previously exposed to carbon tetrachloride. Blood samples were collected for assaying serum biochemical parameters (ALT and AST). Livers and kidney from all animals were excised for evaluation the activities of antioxidant enzymes, namely catalase (CAT), glutathione-S-transferases (GSTs), and total and selenium-dependent glutathione-peroxidase (GPx). Histological studies were also performed on liver, kidney and spleen.

No differences were found in the levels of serum transaminases (ALT and AST) between the control group and *I.crithmoides*, which shows that the aqueous extract does not appear to be toxic.

Analysis of histological sections showed inflammatory infiltrates, hemorrhagic foci, steatosis and centrilobular necrosis in mice exposed to CCl₄ and revealed the regeneration of organs in mice treated with CCl₄ and extract *I.crithmoides*. The restoration of the levels of antioxidant enzymes (CAT, GPx and GSTs) has shown to be inconsistent. Then, the antioxidant property of the extract was not evident.

The results of this study suggest that the aqueous extract of *I. crithmoides* (250 mg / kg) has no hepatoprotective effect. However, the hepatoprotective feature may be considered.

ÍNDICE

ÍNDICE	7
Índice de Figuras.....	9
Índice de Tabelas	10
Abreviaturas.....	11
1.INTRODUÇÃO.....	12
1.1.Importância das plantas medicinais	12
1.2. Planta em estudo: <i>Inula crithmoides</i>	13
1.2.1. Actividades biológicas e farmacológicas	14
1.2.2. Actividade biológica dos flavonóides	14
1.3. Órgãos em estudo	16
1.3.1. Baço	16
1.3.2. Rim	17
1.3.3. Fígado	19
1.4. Biotransformação.....	20
1.5. Hepatotoxicidade - avaliação bioquímica das funções hepáticas	21
1.6. Tetracloreto de carbono (CCl₄) como indutor de hepatotoxicidade	22
1.7. Stress oxidativo	23
1.7.1. Defesas antioxidantes enzimáticas.....	24
2.OBJECTIVOS.....	26
3.MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Colheita de <i>Inula crithmoides</i> e obtenção do extracto	27
3.2.Estudos <i>in vivo</i>	27
3.2.1. Animais	27
3.2.2. Delineamento experimental.....	28
3.2.3. Preparação histológica das amostras.....	29
3.3.Estudos bioquímicos.....	29
3.3.1. Transaminases séricas (ALT e AST)	29
3.3.2. Enzimas anti-oxidantes	29
3.3.2.1.Catalase (CAT).....	30
3.3.2.2. Glutathione-s-transferases (GST)	30
3.3.2.3. Glutathione peroxidase (GPx)	31
3.4. Análise estatística	31
4. RESULTADOS	32
4.1. Estudos <i>in vivo</i>	32
4.1.1. Comportamento dos animais	32
4.1.2. Peso corporal e peso relativo dos órgãos.....	32
4.1.3. Observação macroscópica dos órgãos	33
4.2. Análise histológica.....	34
4.2.1. Observação histologia do fígado.....	34

4.2.2. Observação histológica do rim	36
4.2.3. Observação histológica do baço.....	38
4.3. Análise bioquímica.....	40
4.3.1. Transaminases séricas (ALT e AST)	40
4.3.2. Enzimas antioxidantes.....	41
4.3.2.1. Catalase (CAT).....	41
4.3.2.2. Glutathione-s-transferase (GST)	42
4.3.2.3. Glutathione peroxidase (GPx)	44
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	50
7. BIBLIOGRAFIA.....	51

Índice de Figuras

FIGURA 1: PARTE AÉREA FLORIDA DE <i>INULA CRITHMOIDES</i>	13
FIGURA 2: ESTRUTURA BASE DOS FLAVONÓIDES	15
FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO BAÇO COM OS SEUS PRINCIPAIS COMPONENTES	16
FIGURA 4: (A) CORTE ESQUEMÁTICO DO RIM REPRESENTANDO A TOPOGRAFIA GERAL DO ÓRGÃO (B) REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO NEFRÔNIO E DOS SEUS PRINCIPAIS COMPONENTES	18
FIGURA 5: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRUTURAS DO LÓBULO HEPÁTICO	20
FIGURA 6: GRÁFICO DA EVOLUÇÃO DOS PESOS CORPORAIS DOS RATINHOS DE CADA GRUPO AO LONGO DO TEMPO.	33
FIGURA 7: MICROFOTOGRAFIAS DOS CORTES HISTOLÓGICOS DO FÍGADO DOS RATINHOS	35
FIGURA 8: MICROFOTOGRAFIAS DOS CORTES HISTOLÓGICOS DO RIM DOS RATINHOS	37
FIGURA 9: MICROFOTOGRAFIAS DOS CORTES HISTOLÓGICOS DO BAÇO DOS RATINHOS	39
FIGURA 10: VALORES MÉDIOS DA ALT SÉRICA DOS VÁRIOS GRUPOS DE TRATAMENTO	41
FIGURA 11: VALORES MÉDIOS DA AST SÉRICA DOS VÁRIOS GRUPOS DE TRATAMENTO.....	41
FIGURA 12: EFEITO DOS TRATAMENTOS NA ACTIVIDADE DA CATALASE NO FÍGADO DOS RATINHOS.	42
FIGURA 13: EFEITO DOS TRATAMENTOS NA ACTIVIDADE DA CATALASE NOS RINS DOS RATINHOS.....	42
FIGURA 14: EFEITO DOS TRATAMENTOS NA ACTIVIDADE DA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE NOS FÍGADOS DOS RATINHOS.	43
FIGURA 15: EFEITO DOS TRATAMENTOS NA ACTIVIDADE DA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE NOS RINS DOS RATINHOS.	43
FIGURA 16: EFEITO DOS TRATAMENTOS NA ACTIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE TOTAL NOS FÍGADOS DOS RATINHOS.....	44
FIGURA 17: EFEITO DOS TRATAMENTOS NA ACTIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE TOTAL NOS RINS DOS RATINHOS.	44
FIGURA 18: EFEITO DOS TRATAMENTOS NA ACTIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE SELÊNIO-DEPENDENTE NOS FÍGADOS DOS RATINHOS.	45
FIGURA 19: EFEITO DOS TRATAMENTOS NA ACTIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE SELÊNIO-DEPENDENTE NOS RINS DOS RATINHOS.	45

Índice de Tabelas

TABELA I: PESO CORPORAL E PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS DOS CONTROLOS E DOS TRATAMENTOS	33
TABELA II: QUADRO DEMONSTRATIVO DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS QUALITATIVAS HEPÁTICAS DOS ANIMAIS NOS DIFERENTES GRUPOS.	36
TABELA III: QUADRO DEMONSTRATIVO DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS QUALITATIVAS RENAI DOS ANIMAIS NOS DIFERENTES GRUPOS.	38
TABELA IV: QUADRO DEMONSTRATIVO DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS QUALITATIVAS DO BAÇO DOS ANIMAIS NOS DIFERENTES GRUPOS.	40

Abreviaturas

ALT: Alanina aminotransferase

AST: Aspartato aminotransferase

CAT: Catalase

CCl_3^\bullet : Radical livre triclorometilo

CCl_4 : Tetracloroeto de Carbono

$\text{CCl}_3\text{OO}^\bullet$: Radical triclorometilperoxilo

CYPs: citocromos P450

DNA: Ácido desoxirribonucleico

GPx : Glutathione peroxidase

GSH : Glutathione

Gred: Glutathione reductase

GSSG: Glutathione oxidada

GST: Glutathione- S-transferase

H_2O_2 : Peróxido de hidrogénio

HO^\bullet : Radical hidroxilo

Hsp: proteína de choque térmico

H & E: Hematoxilina e Eosina

IC: *Inula crithmoides*

NaCl: Cloreto de sódio

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reduzida)

NO^\bullet : Óxido nítrico

O_2^\bullet : Radical superóxido

O_2^{2-} : Ânion superóxido

RNS: espécies reactivas de azoto

ROOH: Hidroperóxidos orgânicos

ROS: Espécies reactivas de oxigénio

SOD: Superóxido dismutase

Afim de facilitar o seu reconhecimento, para algumas algumas abreviaturas manteve-se a notação anglo-saxónica dado o seu carácter universal.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância das plantas medicinais

Os relatos do uso das plantas e dos respectivos extractos, no tratamento de diversos sintomas, remontam já de milhares de anos (Jones, 1996) o que denota um conhecimento e reconhecimento das suas propriedades. De facto, foram as observações populares sobre o uso e a eficácia dessas plantas que contribuíram, de forma relevante, para a divulgação das virtudes terapêuticas dos extractos vegetais, despertando o interesse de investigadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo a botânica, a farmacologia, a fotoquímica e a fitoterapia (Maciel *et al.*, 2002).

Actualmente, as plantas medicinais são cada vez mais uma alternativa às drogas sintéticas, na medida em que proporcionam aos utilizadores uma melhor tolerância por parte dos compostos naturais e consequente diminuição das reacções alérgicas. As plantas medicinais, assim como os seus extractos são usados para o tratamento e prevenção de diversas patologias humanas, incluindo cardiovasculares, gastrointestinais, nervosas, cutâneas, entre outras (Proença da Cunha *et al.*, 2006).

As plantas, caracterizam-se por uma multiplicidade de constituintes químicos, uns normalmente presentes em todas as plantas, outros, resultantes do metabolismo secundário, apresentam uma distribuição restrita a algumas famílias, géneros ou mesmo espécie (Proença da Cunha *et al.*, 2006). São estes metabolitos secundários, muitas vezes presentes em pequenas quantidades, que parecem estar associados aos efeitos terapêuticos das plantas (Maciel *et al.*, 2002).

É muito comum a existência de uma variabilidade química nas plantas que é mais significativa nas espécies aromáticas, as quais apresentam compostos aromáticos na sua constituição. Esta variabilidade surge como consequência de factores ambientais, nomeadamente edáficos, e factores associados à própria fisiologia e/ou genoma das plantas, fundamentando a existência, no mesmo *taxon*, de composições químicas quantitativa e qualitativamente muito distintas.

Poder-se-á pensar que apenas os constituintes activos desenvolverão um tipo de actividade específica. No entanto, em muitos casos, são os compostos aparentemente inactivos que protegem os constituintes activos de alterações (ex: oxidações, hidrólises),

podendo até permitir uma melhor absorção pelo organismo ao facilitarem a passagem através das membranas ou ao inibirem sistemas enzimáticos. Entende-se, por isso, o facto de uma determinada planta, ou de um extracto com um dado constituinte, poder ter uma acção superior relativamente à mesma quantidade de constituinte activo isolado (Proença da Cunha *et al.*, 2006).

A proliferação das chamadas “medicinas alternativas”, e a crença generalizada que os produtos naturais são inócuos, impedem que muitas vezes estas substâncias sejam consideradas como etiologia de reacções tóxicas. Consequentemente, a sua regulamentação é dificultada, uma vez que os seus utilizadores raramente declaram a sua utilização numa consulta médica. Deste modo, torna-se imperativo divulgar, educar e consciencializar a população para o uso correcto e consciente destas alternativas terapêuticas promissoras.

1.2. Planta em estudo: *Inula crithmoides*

O género *Inula*, pertencente à família Compositae (Asteraceae) compreende cerca de 100 espécies entre as quais *Inula crithmoides* L., de nome vernáculo madoqueira-bastarda ou campana da praia (Fig.1). Este género encontra-se distribuído pela Europa, África e Ásia, em solos arenosos e salgados do litoral e também fendas de rochas costeiras (Boulos, 1983).

Inula crithmoides é um subarbusto lenhoso, podendo atingir até 100 cm de altura, com folhas lineares a lineares-lanceoladas, carnudas, inteiras ou tri-dentadas no ápice, e com as flores reunidas em capítulos (Franco, 1984).



Figura 1: Parte aérea florida de *Inula crithmoides*

As suas flores são utilizadas na medicina tradicional no tratamento de bronquites, tuberculose, anemia, malária e doenças ligadas ao sistema urinário (Boulos, 1983).

Quimicamente, são típicas deste género as lactonas sesquiterpénicas e flavonóides (Wollenweber *et al.* 1991; Bai *et al.* 2006). Em *I. crithmoides* os compostos

farmacologicamente activos mais estudados são os flavonóides: cirsimarina, neptina, inucritmina e quercetagina (Selim *et al.*, 2003).

1.2.1. Actividades biológicas e farmacológicas

Poucos são os estudos realizados respeitantes às diferentes propriedades biológicas das várias espécies de *Inula*. *Inula graveolens*, espécie mais estudada, revelou possuir actividade antifúngica e bactericida (Ali-Shtayeh *et al.* 1998, Tan *et al.* 1998), cardioprotectora (Miller, 1998; Seth *et al.*, 1998), citotóxica (Wang *et al.* 1996) e hepatoprotectora (Song *et al.* 2000).

Iijima (1995) refere que *Inula britannica* possui um efeito preventivo na hepatite experimental induzida por *Propionibacterium acnes* e lipossacarídeos no rato, sendo posteriormente confirmada esta propriedade por outros investigadores (Song *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2002).

O extracto alcoólico da raiz de *Inula racemosa* diminui os níveis de glucose no sangue (Tripathi, 1995) e demonstra capacidade de regulação dos corticosteróides (Gholap e Kar 2003). Shan e seus colaboradores (2006) verificaram que o extracto aquoso das flores de *Inula japonica* apresentou propriedades semelhantes a *Inula racemosa*, na medida em que também ela induziu significativamente a redução dos níveis de glucose no sangue de ratos diabéticos.

Saygi (2003) estudou o extracto aquoso da raiz de *Inula heterolepis* e verificou que este possuía um efeito terapêutico em lesões do fígado, rim e testículo provocadas pelo álcool.

Mais recentemente, Abdel-Wahhab (2008) refere que *Inula crithmoides* possui um efeito protector na citotoxicidade resultante da ochratoxina A.

1.2.2. Actividade biológica dos flavonóides

As plantas produzem uma grande variedade de substâncias, que não possuem acção directa na fotossíntese, respiração, síntese de proteínas, sendo considerados compostos

produzidos pelo metabolismo secundário. De entre estes metabolitos destacam-se os flavonóides, o maior grupo de compostos fenólicos. Estão descritos mais de 8000 compostos que existem naturalmente numa variedade de alimentos de origem vegetal como frutas, sementes, folhas e flores. Genericamente são considerados como pigmentos dos vegetais responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelha das flores (Rice-Evans, 1996).

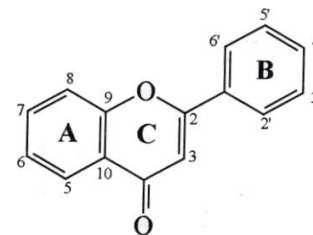


Figura 2: Estrutura base dos flavonóides

Os flavonóides são moléculas de baixo peso molecular, presentes sempre na cutícula das partes aéreas das plantas e tem por base a estrutura da flavona (Fig.2). Dependendo das suas estruturas químicas os variados flavonóides manifestam diferentes actividades farmacológicas (Havsteen 2002).

Nas plantas, os flavonóides possuem diversas funções, tais como a protecção contra os raios ultravioleta, antioxidantes, antifúngicos, repelentes de predadores, antimicrobianos, atractores de polinizadores, entre outras (Pietta 2000). Estas funções observadas na biologia vegetal são por vezes aproveitadas para explorar actividades terapêuticas na biologia humana. Os flavonóides representam, por exemplo, um potencial antioxidante muito importante na dieta humana (Proença da Cunha *et al.*, 2006)

As bases bioquímicas mais correntes para o efeito antioxidante dos flavonóides ligam-se à inibição da peroxidação lipídica. No entanto, devido à estrutura polifenólica, essa inibição pode resultar da possibilidade de complexarem os metais de transição, como é o caso do ferro, frequentemente usado como indutor de peroxidação (Proença da Cunha *et al.*, 2006).

Para além da sua actividade antioxidante, aparecem também descritas as acções hepatoprotectoras e anti-inflamatórias destes compostos. Alguns estudos demonstraram que os flavonóides possuem a capacidade de inibir a actividade da monoxigenase, lipoxigenase e cicloxigenase (Ulicna et al. 2003). Estes fitoquímicos actuam ainda como agentes quelantes de metais de transição, principalmente o ferro e o cobre, inibindo a formação do radical hidroxilo (Havsteen, 2002). Podem também inibir e/ou modular a actividade dos citocromos P-450 (CYPs), aumentando ou reduzindo as concentrações de diversos fármacos no plasma (Hodek *et al.* 2002).

Apesar do grande número de estudos realizados, os flavonóides continuam a atrair a atenção dos investigadores devido às suas variadíssimas propriedades (anticarcinogénica,

antialérgica, anti-inflamatória, antifúngica, cardioprotectora, entre outras), aliadas ao facto de que estes compostos, apresentarem toxicidade reduzida para o Homem (Proença da Cunha, 2006).

1.3. Órgãos em estudo

1.3.1. Baço

O baço é o maior órgão linfático do organismo encontrando-se situado no abdómen. Graças à sua localização, contacto directo com o sistema circulatório e abundância de células fagocitárias, o baço representa um importante órgão na defesa do organismo, actuando como um filtro contra organismos patogénicos presentes no sangue circulante, eritrócitos envelhecidos e detritos celulares (Burkitt, 1996).

O baço é revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo denso que emite trabéculas (artérias trabeculares) que dividem o parenquima ou polpa esplénica em compartimentos incompletos: a polpa vermelha e a polpa branca (Fig. 3) (Telford *et al.*, 1995).

A primeira constitui 75% do volume do baço e é formada por cordões esplénicos (cordões de Billroth), separados por sinusóides e contém linfócitos, e macrófagos (Burkitt, 1996).

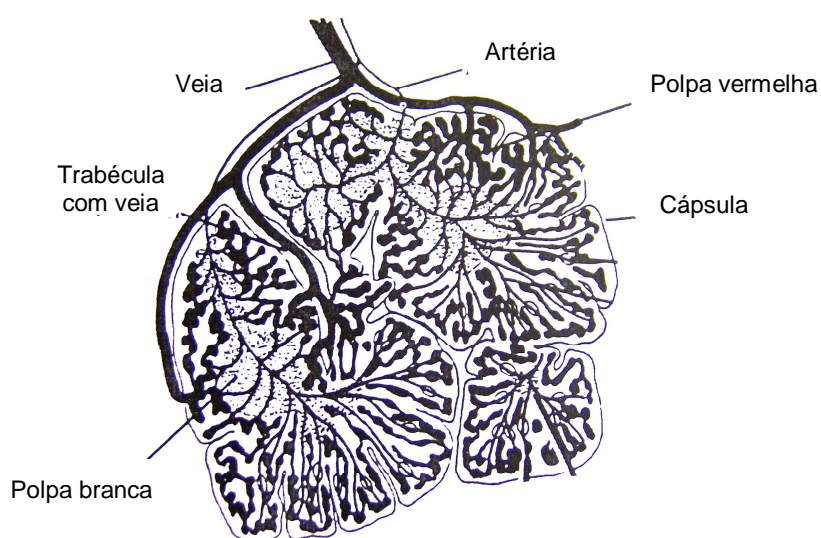


Figura 3: Representação esquemática do baço com os seus principais componentes (adaptado de Haschek e Rousseaux).

A polpa branca, responsável pela produção de linfócitos, que contém cerca de um quarto de linfócitos do total presentes no organismo e é constituída pelo tecido linfático (com predominância de linfócitos T) e por nódulos linfáticos (com predominância de linfócitos B) (Haschek *et al.*, 1998;Junqueira *et al.*, 2008).

Para além dos linfócitos, a polpa branca contém monócitos, células plasmáticas e macrófagos. Estes desempenham uma função importante na destruição das hemáceas envelhecidas e na fagocitose das partículas inertes presentes no sangue.

Entre a polpa branca e a vermelha existe uma área mal definida, constituída maioritariamente pelas arteríolas dos seios marginais, designada por zona marginal. Esta zona possui muitos antígenos transportados pelo sangue, daí ser uma área importante na filtração dos mesmos (Telford *et al.*, 1995).

A dinâmica apresentada pelo sistema imunitário proporciona uma grande capacidade regeneradora. Desta forma, após a exposição a xenobióticos capazes de destruir o sistema imunitário, a regeneração ocorre num período de tempo relativamente curto, podendo a anatomia original ser restaurada ao fim de 3 a 4 semanas (Haschek *et al.*, 1998).

1.3.2. Rim

O rim contribui para a homeostasia do organismo, regulando a composição do meio interno. Para além do referido, o rim tem uma função endócrina, ao sintetizar hormonas, tais como a eritropoietina, renina e prostaglandinas (Junqueira *et al.*, 2008).

O parênquima renal (Fig. 4a) apresenta duas zonas bem distintas: a zona cortical, situada mais externamente, constituída principalmente por nefrónios corticais e a zona medular, formada fundamentalmente por túbulos que se vão coalescendo noutros maiores, até à pelve renal (Telford *et al.*, 1995).

A unidade funcional e estrutural do rim é o nefrónio (Fig. 4b), constituído por glomérulo (corpúsculo renal), túbulo proximal, ança de Henle, túbulo distal e ducto colector. O glomérulo consiste numa rede capilar especializada, através da qual o sangue penetra pela arteríola aferente, saindo através da eferente. Assim, o glomérulo assume a função de filtrar o sangue e simultaneamente o sistema de túbulos colectores absorve parte do filtrado nos glomérulos.

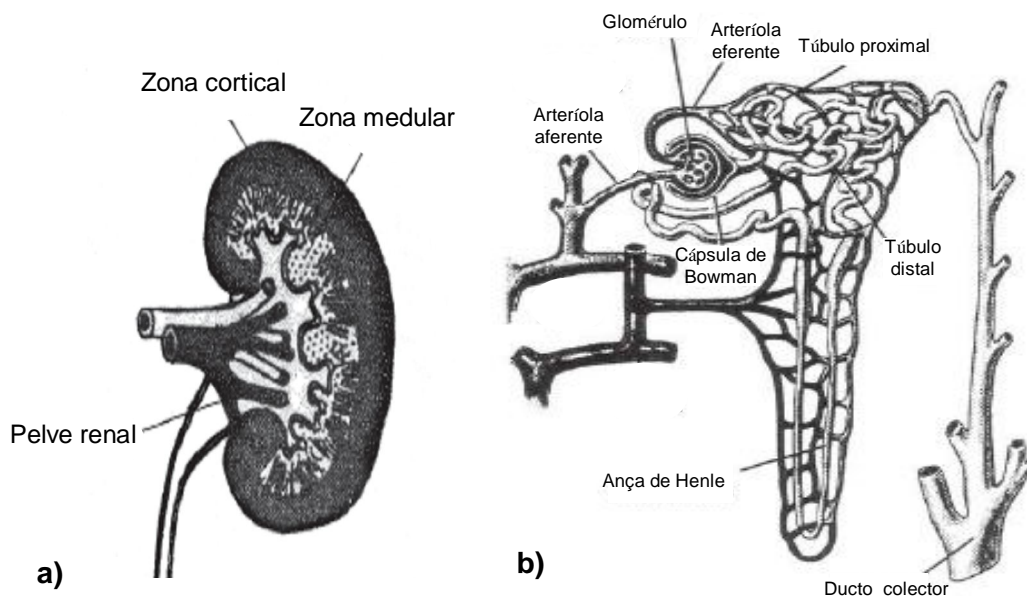


Figura 4: (a) Corte esquemático do rim representando a topografia geral do órgão (b) representação esquemática do nefrônio e dos seus principais componentes (adaptado de Burkitt, 1996)

Embora constituam apenas 0,5% do peso corporal, os rins recebem cerca de 20 a 25% do fluxo sanguíneo. Consequentemente, qualquer xenobiótico que atinja a circulação sistêmica atingirá os rins em teores elevados. Deste modo, os rins são muito susceptíveis à lesão por diversos xenobióticos, sendo o túbulo proximal o alvo mais comum, devido em parte, à capacidade selectiva de acumulação de determinados xenobióticos nesse segmento do nefrônio (Haschek *et al.*, 1998).

Como resposta a esta susceptibilidade, os rins possuem capacidade de regeneração e também um certo número de respostas celulares e moleculares. Um exemplo é a resposta ao choque térmico, na qual proteínas de choque térmico (Hsp) são induzidas como resposta a estados fisiopatológicos tais como o choque térmico, a anóxia, o stress oxidativo, tóxicos e exposição a metais pesados. Supõe-se que estas proteínas desempenham um papel importante na manutenção da estrutura normal das proteínas e na degradação das proteínas danificadas, sendo consequentemente, activados mecanismos de defesa contra a toxicidade, facilitando a recuperação e a regeneração renais (Klaassen e Watkins, 2001).

Também se destacam, enzimas de metabolização de xenobióticos, incluindo o citocromo P-450, tal como ocorre no fígado, embora no caso renal não sejam tão significativas (Haschek *et al.*, 1998).

A regeneração do rim compreende fenómenos como o aumento precoce da síntese do ADN, proliferação, migração e diferenciação das células viáveis adjacentes ao local das lesões (Klaassen e Watkins, 2001).

1.3.3. Fígado

O fígado é a maior glândula e o segundo maior órgão do corpo humano, pesando entre 1,4 Kg e 1,6 Kg e perfazendo cerca de 2% do peso corporal no adulto. Em ratos e ratinhos ele representa aproximadamente 3,5% do peso corporal. A sua fisionomia externa é muito semelhante em todas as espécies. Todavia, os lóbulos são muito diferentes em forma e dimensão (Haschek *et al.*, 1998).

O fígado localiza-se no quadrante superior direito da cavidade abdominal, abaixo do diafragma. Este facto permite o desempenho de múltiplas funções, nomeadamente: a captação, metabolismo e armazenamento de nutrientes, a síntese de proteínas plasmáticas, a secreção da biliar, a regulação do volume sanguíneo, a filtração mecânica de macromoléculas, a protecção e a desintoxicação de xenobióticos (Desmet, 2001). Além disso, o fígado possui uma grande capacidade de regeneração.

O fígado é formado por unidades estruturais e funcionais, designadas por hepatócitos que representam cerca de 80% da população celular. São células poligonais, polarizadas, com 20 a 30 µm de diâmetro que apresentam um núcleo esférico, de posição central com um invólucro nuclear distinto e um ou mais nucléolos proeminentes. Apresenta ainda hepatócitos binucleados (Junqueira e Carneiro, 2008).

Os hepatócitos estão intimamente associados à rede de capilares sanguíneos, designados por sinusóides hepáticos e são responsáveis pela grande parte das funções bioquímicas do fígado.

Os lóbulos hepáticos (Fig.5) estão organizados em cordões de hepatócitos que se dispõem radialmente a partir da veia central. Entre os lóbulos localizam-se os ramos da artéria hepática que fornecem sangue arterial aos tecidos do septo, abrindo-se directamente nos sinusóides hepáticos. Por outro lado, a veia porta transporta substâncias absorvidas pelo tracto digestivo para remoção e conversão metabólica (Telford *et al.*, 1995)

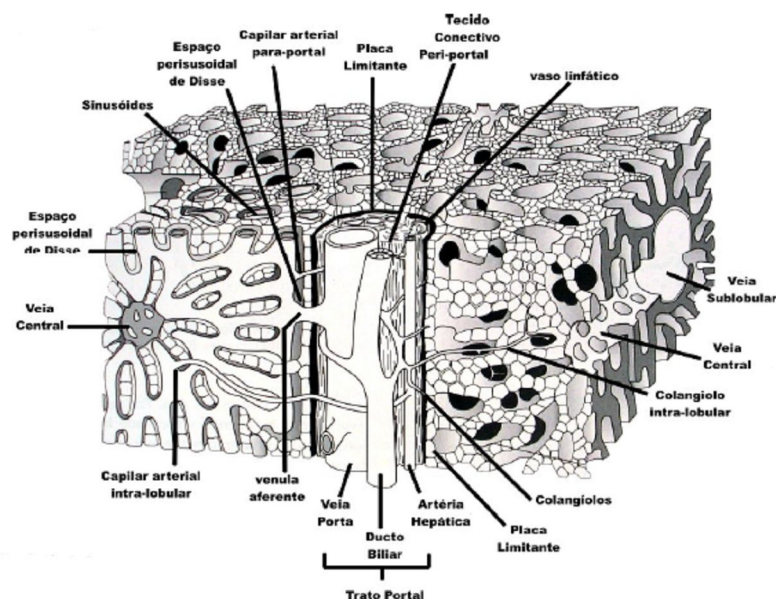


Figura 5: Representação esquemática das estruturas do lóbulo hepático (adaptado de Sherlock e Dooley, 2002)

Todas as funções do fígado são passíveis de ser alteradas por lesões resultantes de uma exposição aguda ou crónica a agentes tóxicos. As respostas hepáticas a agressões por compostos químicos dependem da intensidade da agressão, da população de células afectadas e da circunstância da exposição ser aguda ou crónica (Klaassen e Watkins, 1999).

1.4. Biotransformação

O fígado é o principal órgão responsável pela biotransformação (Hodgson e Levi, 1994). A biotransformação de xenobióticos consiste na conversão de substâncias lipofílicas em substâncias polares, passíveis de excreção. Esse processo é crucial para a eliminação de compostos tóxicos e o metabolismo é realizado por enzimas que se localizam principalmente no retículo endoplasmático (Timbrell 1991), sendo o CYP450, GST e UGT, os principais sistemas enzimáticos envolvidos (Lewis, 1996).

As reacções envolvidas na biotransformação de xenobióticos podem agrupar-se em duas fases distintas: Fase Pré-Sintética ou Fase I, onde ocorrem reacções de oxidação, redução e hidrólise, com introdução de um grupo polar à molécula, aumentando a sua reactividade química; e Fase Sintética, de Conjugação ou Fase II, onde ocorrem reacções

de conjugação, aumentando a polaridade dos xenobióticos e facilitando a sua excreção (Klaassen e Watkins, 1999).

As reacções integrantes na fase I têm como finalidade primordial, expor ou incorporar novos grupos funcionais (-OH, -NH₂, -SH), o que poderá elevar a hidrofília e diminuir a toxicidade do xenobiótico.

Uma das reacções mais importantes da fase I é a oxidação microsomal, cujas enzimas predominantes são as mono-oxigenases, também designadas por oxidases de função mista, dado que numa reacção típica é consumida uma molécula de substrato, surgindo um átomo de oxigénio no produto e outro na molécula de água. (Hodgson; e Levi, 1994).

As reacções de fase II são reacções de conjugação que envolvem a adição de grupos endógenos aos xenobióticos, geralmente polares. As reacções integrantes nesta fase incluem, a glucoronidação, sulfatação, acetilação, metilação, conjugação com a glutatona e a conjugação com aminoácidos (Klaassen e Wattkins, 1999). Entre estas, a conjugação com a glutatona é a principal via para a inactivação e posterior excreção de compostos endógenos e xenobióticos nos mamíferos (Timbrell, 1991).

1.5. Hepatotoxicidade - avaliação bioquímica das funções hepáticas

As doenças hepáticas são um problema de saúde pública mundial, sendo que a evolução das mesmas inicia-se com a hepatite, esteatose, fibrose e cirrose até o carcinoma hepatocelular (Loguercio e Federico 2003; Vitaglione *et al.*, 2004).

A confirmação do dano hepático é realizada por meio de exames de diagnóstico serológicos específicos, como a doseamento da actividade enzimática das transaminases (AST e ALT) (Henry et al., 1999). As actividades mais elevadas da AST encontram-se no miocárdio, fígado, músculo-esquelético, apresentando os rins, pâncreas, baço, cérebro, pulmões e eritrócitos valores mais reduzidos.

A ALT localiza-se principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto que 80% da AST dos hepatócitos estão presentes nas mitocôndrias (Plaa, 2000). Por este motivo, grandes elevações nos níveis séricos da AST, quando associados a outros indicadores (bioquímicos e histológicos) de dano hepático, podem representar dano mitocondrial dos

hepatócitos. Em dano hepatocelular leve a forma encontrada no soro é predominantemente citoplasmática, enquanto nas lesões mais graves há libertação da enzima mitocondrial. Compreende-se deste modo a utilização destes marcadores no delineamento do tipo de dano hepático, a sua extensão e o prognóstico da doença hepática. Todavia, somente as técnicas histopatológicas confirmam e complementam a avaliação do dano, auxiliando também na verificação precoce da efectividade de terapias que protejam e/ou revertam as lesões hepáticas causadas por diversos agentes (Henry *et al.*, 1999).

1.6. Tetracloreto de carbono (CCl₄) como indutor de hepatotoxicidade

O tetracloreto de carbono (CCl₄) é um hidrocarboneto halogenado extremamente tóxico. Foi amplamente utilizado como solvente, agente de limpeza, extintor de incêndio, intermediário sintético, fumigante e anti-helmíntico para os seres humanos. Todavia, a partir de 1970, a sua utilização diminuiu devido à sua elevada toxicidade hepatorenal, carcinogenicidade e contribuição para a redução da camada do ozono na atmosfera. (Basu 2003). Actualmente o CCl₄ está proibido em produtos destinados ao uso doméstico (HSDB, 2000).

A solubilidade do CCl₄ em lípidos faz com que o mesmo atravesse a membrana celular, afectando muitos órgãos tais como o fígado, rins, coração, pulmões, testículo, cérebro e sangue (Basu 2003), apesar disso o tetracloreto de carbono é classicamente conhecido por causar hepatotoxicidade, no entanto, também é descrito que a exposição a este composto induz dano renal crónico (Tirkey *et al.*, 2005).

Os primeiros sinais de lesão hepatocelular em ratos incluem a dissociação de polissomas e ribossomas do retículo endoplasmático rugoso, desorganização do retículo endoplasmático liso, inibição da síntese proteica e acumulação de triglicéridos. A necrose celular ocorre entre as 24h e as 48h (Tirkey *et al.*, 2005). A hepatotoxicidade induzida pelo CCl₄ tem origem numa reacção de desalogenação catalisada pelo citocromo P-450, de que resulta um radical muito reactivo: o triclorometilo (CCl₃•). Este radical livre pode reagir com o oxigénio, formando o radical triclorometilperóxido (CCl₃OO•). Deste modo, inicia-se uma reacção em cadeia que interfere com moléculas celulares importantes tendo como

consequência alterações da fisiologia celular, aumento da peroxidação lipídica, redução da quantidade de glutathione com consequente dano e/ou morte celular (Lima *et al.*, 2007).

Apesar da utilização do CCl_4 ser restrita como intermediário em reacções químicas, a sua utilização em protocolos experimentais auxilia a compreensão dos mecanismos de hepatotoxicidade.

1.7. Stress oxidativo

Em organismos saudáveis, ocorre uma produção endógena e contínua de espécies químicas intermediárias derivadas do metabolismo aeróbio, que tendem a reagir rapidamente com estruturas celulares. Estas espécies intermediárias caracterizam-se por exibirem uma curta duração, mas elevada reactividade. A eliminação das espécies reactivas de oxigénio é realizada pelos sistemas de defesa antioxidante no organismo. Quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e a defesa antioxidante, cria-se um estado ao qual se denomina stress oxidativo (Cross *et al.*, 2002). Em suma, o stress oxidativo corresponde a uma excessiva formação endógena de espécies reactivas de oxigénio (ROS), associada a uma diminuição nas defesas antioxidantes (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Existem vários tipos de espécies reactivas, incluindo as espécies reactivas de oxigénio (ROS), das quais fazem parte o anião superóxido (O_2^-), o radical hidroxilo, peróxido de hidrogénio (H_2O_2), radicais peróxidos (ROOH), entre outros e espécies reactivas de nitrogénio (RNS), como o óxido nítrico (Ulicna *et al.*, 2003).

Os factores responsáveis pela ocorrência de radicais livres em excesso, que ultrapassam a capacidade de eliminação natural do organismo, são a exposição cumulativa às radiações, a intoxicação com determinados produtos químicos ou medicamentosos, peroxidação ou reoxigenação intensa de determinados tecidos privados de oxigénio, processos inflamatórios, obesidade, nutrição deficiente, stress, hábitos tabágicos e alcoolismo (Proença da Cunha, 2006).

As ROS podem induzir um grande número de alterações nos constituintes celulares, incluindo inactivação de enzimas, danos nas bases nitrogenadas dos ácidos nucleicos e nas proteínas, além de peroxidação dos lipídios membranares (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Para prevenir o dano causado pelas ROS, os sistemas biológicos desenvolveram sistemas de defesa antioxidante, que incluem antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos que actuam conjuntamente na protecção celular (Chaudiere, 1999).

Segundo Halliwell e Gutteridge (1999), um antioxidante pode ser definido como “qualquer substância que quando presente em baixas concentrações, comparadas às de um substrato oxidável, retarda ou previne significativamente a oxidação desse substrato”.

1.7.1. Defesas antioxidantes enzimáticas

Os antioxidantes enzimáticos são formados por várias enzimas das quais se destacam a catalase (CAT), glutathione-S-transferase e glutathione peroxidase (GPx) (Tieppo, 2006).

A GSH é um tripeptídeo, contendo cisteína, ácido glutâmico e glicina e é o tiol não-proteico mais abundante nos mamíferos, podendo ser considerado um dos agentes mais importantes dos sistemas de defesas antioxidantes. Actua também como transportadora e reservatório de cisteína e participa na destoxificação de agentes químicos e eliminação de produtos de lipoperoxidação (Noctor e Foyer, 1998).

A GSH actua em conjunto com duas outras enzimas, a glutathione peroxidase (GSH-Px) e a glutathione reductase (Gred), formando um sistema. A versatilidade das suas propriedades químicas faz com que funcione como um eficiente agente redutor (Scandalios *et al.*, 1997).

Através das isoenzimas glutathione-S-transferases (GSTs), a GSH pode destoxificar potentes agentes alquilantes, electrofílicos, incluindo compostos farmacologicamente activos como herbicidas, pesticidas e xenobióticos e também aldeídos (como malondialdeído), gerados durante a peroxidação lipídica. Desta forma, as GSTs catalisam a reacção destes compostos alquilantes com o grupo -SH da glutathione, neutralizando assim os seus locais electrofílicos e transformando-os em produtos mais hidrossolúveis, consequentemente de mais fácil excreção (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Uma outra enzima antioxidante é a catalase, responsável pela remoção do H_2O_2 proveniente da dismutação do radical superóxido por acção da enzima superóxido dismutase. Aquando da presença de elevadas concentrações de H_2O_2 esta enzima tetramérica que contém um grupo heme, converte esta molécula em água e oxigénio

molecular, através de uma reacção catalítica, na qual o H_2O_2 actua quer como receptor, quer como dador de hidrogénio (Scandalios *et al.*, 1997). Apesar desta enzima apresentar uma taxa catalítica muito elevada, possui uma baixa afinidade para o substrato, uma vez que a reacção requer o acesso simultâneo de duas moléculas de H_2O_2 ao centro activo da enzima (Noctor e Foyer, 1998). Assim, as elevadas concentrações de enzima são um pré-requisito necessário para a redução das concentrações de H_2O_2 (Scandalios, 1997).

Em situações em que as concentrações de H_2O_2 são baixas, a CAT pode actuar como peroxidase, onde uma grande variedade de dadores de hidrogénio (etanol, ácido ascórbico) podem ser oxidados (Scandalios *et al.*, 1997).

As peroxidases são enzimas que utilizam doadores de electrões para reduzir o H_2O_2 a água. Talvez a mais importante das peroxidases seja a glutathione peroxidase (GPx), enzima selénio-dependente, que utiliza o tripeptídeo tiólico glutathione reduzida (GSH) como substrato para a decomposição de peróxidos orgânicos, tais como lipoperóxidos provenientes da peroxidação lipídica. Durante o processo catalisado pela GPx, ocorre a oxidação da glutathione, formando-se uma ponte dissulfureto entre duas moléculas de GSH (Wingler e Flohé, 1999).

2.OBJECTIVOS

O objectivo principal do presente trabalho consistiu em avaliar o possível efeito hepatoprotector e hepatoregenerador do extracto de *Inula crithmoides* em ratinhos. Para tal recorreu-se ao estudo histológico do fígado e à determinação dos parâmetros bioquímicos séricos das transaminases para avaliar a função hepática.

Como objectivos secundários avaliaram-se o potencial antioxidante do extracto de *I. crithmoides*, o seu efeito histopatológica no baço e no rim e ainda a resposta da toxicidade induzida pelo CCl₄.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Colheita de *Inula crithmoides* e obtenção do extracto

A colheita de amostras de *Inula crithmoides* foi realizada a 5 de Novembro de 2008, numa zona de sapal da Ria de Aveiro (40° 37' 58" N 8° 39' 41" W). Foram colhidas porções aéreas, nomeadamente inflorescências (capítulos) no estado de frutificação, folhas e caules.

Após a colheita, procedeu-se à secagem do material vegetal, à temperatura ambiente.

O extracto seco das porções aéreas de *I. crithmoides* foi obtido por decocção, utilizando como solvente a água destilada (Abdel-Wahhab *et al.*, 2008). Para tal, procedeu-se à trituração e homogeneização do material vegetal seco recorrendo a um moinho de café. De seguida, 1g do material obtido foi fervido em 100 ml de água destilada durante 10 minutos. O decoto obtido foi filtrado inicialmente com gaze e em seguida com auxílio de bomba de vácuo, com filtro de 0.2µm (Whatman® Schleicher & Schuell®) a fim de remover qualquer tipo de contaminação existente no extracto.

O filtrado foi congelado a -80°C durante 12h e posteriormente liofilizado durante 24h. Por fim, o extracto seco obtido foi acondicionado num exsiccador, com sílica gel a fim de garantir uma atmosfera isenta de humidade, até ao dia da sua administração aos ratinhos.

3.2. Estudos *in vivo*

3.2.1. Animais

No presente estudo utilizaram-se 25 ratinhos machos ICR-CDI, com cerca de 7 semanas e com um peso médio de 30g, provenientes de Charles River Lab. (L'Arbresle, França).

Os ratinhos foram separados em 5 grupos (n=5) e mantidos em gaiolas de policarbonato transparente, numa câmara climatizada durante duas semanas nas condições

do biotério do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro ($22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, humidade relativa 40-60% e fotoperíodo luz/escuridão de 12 horas).

Os animais tiveram acesso a água e ração *ad libitum*, e foram submetidos aos testes experimentais sendo registado o peso dos animais desde o início da experiência.

3.2.2. Delineamento experimental

Os animais foram injectados por via subcutânea, da seguinte forma:

GRUPO I: Controlo positivo com CCl_4 /azeite, na única dose de 1 ml/kg e sacrificado após 24 h;

GRUPO II: Controlo negativo com NaCl 0,9%, com um volume de 0,25 ml durante 5 dias (uma vez por dia);

GRUPO III: Tratamento com extracto de IC (*I. crithmoides*), uma vez por dia durante 5 dias. A dose administrada foi de 0,25g/Kg.

GRUPO IV: Tratamento CCl_4 + IC. O CCl_4 foi injectado na dose de 1 ml/Kg no primeiro dia e nos 5 dias seguintes administrado o extracto de *I. crithmoides* na concentração de 0,25 g/Kg. Este tratamento teve por objectivo avaliar o efeito regenerador do extracto.

GRUPO V: Tratamento de IC + CCl_4 . Os ratinhos foram injectados com o extracto durante 5 dias e ao 6º dia foi administrado o CCl_4 . Este tratamento teve como objectivo avaliar o efeito hepatoprotector do extracto.

Após 24 h da última injeção, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical recolhendo-se amostras de sangue. Foram extraídos os rins, fígado e baço e pesados numa balança (AND modelo HR-120) para estudos histológicos e bioquímicos.

O rim direito, baço e um fragmento do fígado foram imediatamente processados para histologia. O rim esquerdo e restante porção do fígado foram lavados com solução salina (NaCl 0,9%) e conservados separadamente em tubos ependorff numa câmara congeladora a -80°C .

3.2.3. Preparação histológica das amostras

As amostras foram fixadas em formol a 10% durante 24 h. Seguidamente, foram submetidas a uma desidratação com concentrações crescentes de etanol e por último com benzol puro. Após este procedimento, procedeu-se à impregnação e inclusão das amostras em parafina (ponto de fusão 42-44°C e 52°-58°C, respectivamente) recorrendo-se para isso a moldes de plástico. Foram efectuados cortes histológicos com espessura de 4 µm num micrótomo (Leitz modelo 1512) e coloração com hematoxilina e eosina (H&E). Estes foram montados em meio Eukitt e mantidos na estufa a 40° durante 1-2 dias..

Os cortes histológicos foram observados ao microscópio óptico (Olympus modelo BX41TF) com sistema fotográfico acoplado. As alterações histopatológicas respectivas foram classificadas de acordo com o sistema de classificação proposto por Saygi e colaboradores (2003): 0 - inexistentes; (1-2) leve; (3-4) moderado e (5) severo.

3.3. Estudos bioquímicos

3.3.1. Transaminases séricas (ALT e AST)

Após a recolha das amostras de sangue, estas foram enviadas para o laboratório de análises clínicas (AVELAB, Aveiro) onde o sangue foi centrifugado a 3000 x g por 10 min. O soro obtido foi utilizado para a quantificação das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), marcadores de lesão hepatocelular.

3.3.2. Enzimas anti-oxidantes

O rim esquerdo e fragmentos de fígado dos animais foram conservados a -80°C, tal como anteriormente se referiu. Estas amostras foram descongeladas e homogeneizadas num homogeneizador (Yellow line DI 18 basic) num volume de 1 ml de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) com 0,1% de Triton X-100, com vista à realização dos ensaios enzimáticos.

Os tecidos homogeneizados foram centrifugados numa centrifuga (Hettich Zentrifugen; Miko22R) a 15.000 x g, durante 10 min a -4°C. A partir da fracção sobrenadante foram realizados ensaios prévios para a determinação do factor óptimo de

diluição para cada enzima a quantificar. Seguidamente foram realizadas as diluições óptimas das amostras de todos os tratamentos e armazenados a -80°C até às determinações das actividades enzimáticas das enzimas Catalase (CAT), glutathione-S-transferases (GST) e glutathione-peroxidase (total e selénio-dependente) (GPx).

3.3.2.1. Catalase (CAT)

A actividade da catalase foi determinada segundo Aebi (1984) num espectrofotómetro (Jenway; 6505 UV/Vis. Spectrophotometer), que monitorizou a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogénio a 240 nm durante 30 segundos, pela enzima presente na amostra. Utilizou-se a solução de peróxido de hidrogénio (10 mM) em tampão fosfato (50 mM pH 7,0). Após a quantificação da actividade enzimática, procedeu-se à quantificação da proteína solúvel total nas amostras, de modo a expressar a actividade enzimática em função da concentração proteica, de acordo com a metodologia descrita por Bradford (1978). A actividade enzimática foi expressa em U/miligramma de proteína.

Nos ratinhos expostos ao CCl₄ não foi possível determinar a actividade desta enzima, provavelmente devido à destruição extensa do tecido hepático.

3.3.2.2. Glutathione-S-transferases (GST)

A actividade das glutathione-S-transferases (GST) foi determinada espectrofotometricamente de acordo com a metodologia descrita por Habig e colaboradores (1974). As GSTs catalisam a conjugação do substrato 1-cloro-2,4- dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathione (GSH), formando-se um tioéter cuja formação foi monitorizado pelo aumento de absorvância num comprimento de onda de 340 nm, através de um leitor de microplacas (Labsystems; Multiskan Ex). Após a quantificação da actividade enzimática, procedeu à quantificação da proteína solúvel total, tal como o descrito acima. Os resultados foram expressos como nanomoles de tioéter produzido por minuto, por miligramma de proteína.

3.3.2.3. Glutathione peroxidase (GPx)

A actividade da glutathione peroxidase foi determinada por espectrofotometria de acordo com o método descrito por Flohé e Gunzler (1984). Neste ensaio, a oxidação de NADPH foi monitorizada a 340 nm, aquando da redução da glutathione oxidada (GSSG) a (GSH) por acção da glutathione reductase (Gred).

A actividade avaliada utilizando peróxido de hidrogénio (H_2O_2 , 0,255 mM) como substrato corresponde à glutathione peroxidase dependente do selénio e a actividade avaliada utilizando cumeno hidroperóxido (0,7 mM) como substrato corresponde à glutathione peroxidase dependente e não dependente do selénio. Tal como nos casos anteriores, procedeu-se à quantificação da proteína solúvel total na amostra, pelo método de Bradford (1978).

A actividade enzimática foi expressa em nanomoles de NADPH por minuto por miligrama de proteína.

3.4. Análise estatística

Os pesos dos animais e o rácio ($\text{P}_{\text{órgão}}/\text{P}_{\text{f}}\text{)*100}$) dos vários órgãos estudados foram primeiramente normalizados e apresentados como média \pm erro padrão e comparados recorrendo ao teste one-way ANOVA, seguido do post hoc de Tukey (Minitab) com um valor de $p < 0,05$ de significância. Para comparar o crescimento dos animais ao longo do período de tratamento recorreu-se ao teste two-way ANOVA. Para o tratamento estatístico das lesões observadas nos cortes histológicos recorreu-se ao teste de verosimilhança ou teste G. Para o tratamento estatístico dos parâmetros bioquímicos foi efectuado o teste one-way ANOVA, seguido pelo teste Dunnett, de modo a discriminar os diferentes tratamentos em comparação com os organismos controlo.

4. RESULTADOS

4.1. Estudos *in vivo*

4.1.1. Comportamento dos animais

Durante todo o procedimento não se observaram diferenças no consumo de alimento e de água nos grupos I (NaCl) e III (*I. crithmoides*).

Os animais do controlo positivo (CCl₄) revelaram uma diminuição da sua actividade comportamental, nomeadamente na alimentação. A sua pelagem também sofreu alterações visíveis, ao tornar-se progressivamente mais áspera ao toque.

No grupo IV, no qual se administrou primeiramente o tóxico, a sintomatologia revelada pelos animais foi semelhante ao controlo positivo (CCl₄). No entanto, ocorreu a morte de dois animais durante as 48 horas seguintes. Os restantes animais, foram apresentando melhorias progressivas no seu comportamento e na sua fisionomia.

No grupo V, em que foi administrado primeiramente o extracto, os animais apresentaram um comportamento normal durante os cinco dias da administração. Todavia, após a injeção única do CCl₄ observaram-se os sintomas equivalentes aos observados no grupo do controlo positivo (CCl₄).

4.1.2. Peso corporal e peso relativo dos órgãos

A figura 2 mostra que o extracto de *I. crithmoides* (Grupo III) não interfere com o normal crescimento dos ratinhos, dado que não difere significativamente do controlo negativo.

No grupo II, do controlo positivo, é notório um decréscimo significativo do peso corporal após a injeção de CCl₄.

É ainda de salientar que nos animais do grupo IV (CCl₄ + IC), ocorreu uma recuperação progressiva do peso, após o decréscimo brusco provocado pela injeção de CCl₄ no primeiro dia.

Relativamente ao grupo V (IC + CCl₄), observou-se um decréscimo brusco do peso dos animais após a injeção de CCl₄ no último dia do tratamento. No entanto, este decréscimo não mostrou ser estatisticamente significativo, contrariamente ao controlo positivo (CCl₄).

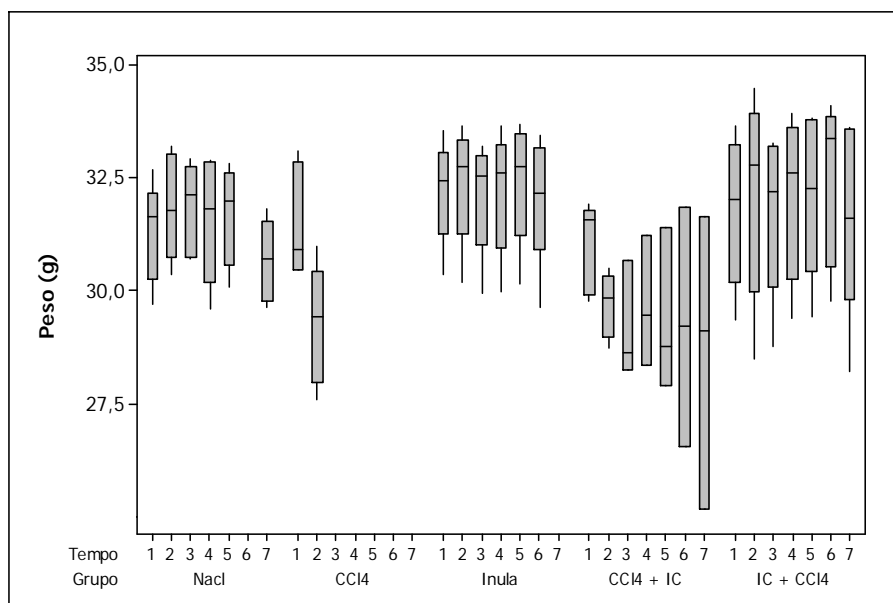


Figura 6: Gráfico da evolução dos pesos corporais dos ratinhos de cada grupo ao longo do tempo.

Relativamente ao peso relativo dos órgãos não se verificaram diferenças significativas no peso do fígado, baço e rins entre os animais dos diferentes grupos (Tabela I).

Tabela I: peso corporal e peso relativo dos órgãos dos controlos e dos tratamentos

grupos ^a	peso corporal (g)	rácios (peso relativo dos órgãos) (g/100g de peso)			
		fígado	baço	rim esquerdo	rim direito
NaCl	30,65 ± 0,81	4,69 ± 0,17	0,27 ± 0,02	0,89 ± 0,06	0,93 ± 0,07
CCl ₄	29,25 ± 0,81	4,77 ± 0,17	0,23 ± 0,02	1,09 ± 0,06	1,07 ± 0,07
IC	32,05 ± 0,81	4,68 ± 0,17	0,32 ± 0,02	0,82 ± 0,06	0,84 ± 0,07
CCl ₄ + IC	28,65 ± 1,04	4,95 ± 0,22	0,34 ± 0,03	0,94 ± 0,08	1,04 ± 0,09
IC + CCl ₄	31,68 ± 0,80	5,11 ± 0,17	0,34 ± 0,02	0,92 ± 0,06	0,92 ± 0,07

^a os valores representados referem-se à média ± SE

4.1.3. Observação macroscópica dos órgãos

Com a finalidade de caracterizar a morfologia dos órgãos removidos (fígado, baço e rins), foram realizadas análises macroscópicas dos órgãos.

No controle negativo (NaCl) e tratamento com extracto de *I. crithmoides* (Grupo III) os órgãos (fígado, rim e baço) apresentaram características normais, tais como uma textura superficial lisa, cor castanho avermelhada e consistência elástica. Contudo, os

órgãos dos animais do controlo positivo (CCl₄), apresentaram alterações evidentes quando comparados aos padrões acima descritos. Assim, o fígado desses animais evidenciou uma textura superficial irregular, aspecto rugoso, consistência rígida, hemorragias perceptíveis e coloração vermelho-esbranquiçada. Os rins apresentaram manchas esbranquiçadas e hemorragias evidentes e no caso do baço observou-se uma fragilidade notória na sua consistência.

Todos os órgãos do grupo V (IC + CCl₄) apresentaram-se semelhantes aos do controlo positivo (CCl₄).

Por último, os fígados e os rins dos animais do grupo IV (CCl₄ + IC) mostraram-se visivelmente idênticos ao controlo negativo (NaCl), no entanto, os baços revelaram uma diminuição na sua consistência e um aparente aumento de volume (esplenomegalia).

4.2. Análise histológica

4.2.1. Observação histologia do fígado

A figura 3 e a Tabela II apresentam os resultados obtidos a partir da análise histológica do fígado dos animais dos vários grupos.

No controlo negativo (Grupo I) assim como no grupo III, exposto ao extracto de *I. crithmoides*, (fig. 3C) observou-se o parênquima hepático aparentemente normal.

Nas amostras dos animais do grupo do controlo positivo, CCl₄, (fig.3B) observou-se necrose centrolobular, resultando na perda do padrão normal lobular do fígado. Observou-se também uma significativa vacuolização dos hepatócitos, esteatose, hemorragias evidentes, processo inflamatório e completa desorganização dos sinusoides.

Nos animais do grupo IV, inicialmente injectados com o CCl₄ e posterior tratamento com o extracto aquoso de *I. crithmoides*, verificou-se uma notória recuperação das lesões provocadas pelo tóxico, tal como demonstrado na Tabela II. Observou-se ainda o rearranjo da morfologia hepática (Fig. 3D), nomeadamente a diminuição da extensão dos focos hemorrágicos, vacuolização dos hepatócitos e necrose centrolobular.

No caso do grupo V, inicialmente tratado com o extracto de *I. crithmoides* e no último dia injectado com CCl₄, observou-se um quadro patológico ligeiramente melhor ao apresentado pelo controlo positivo (Fig.3 E).

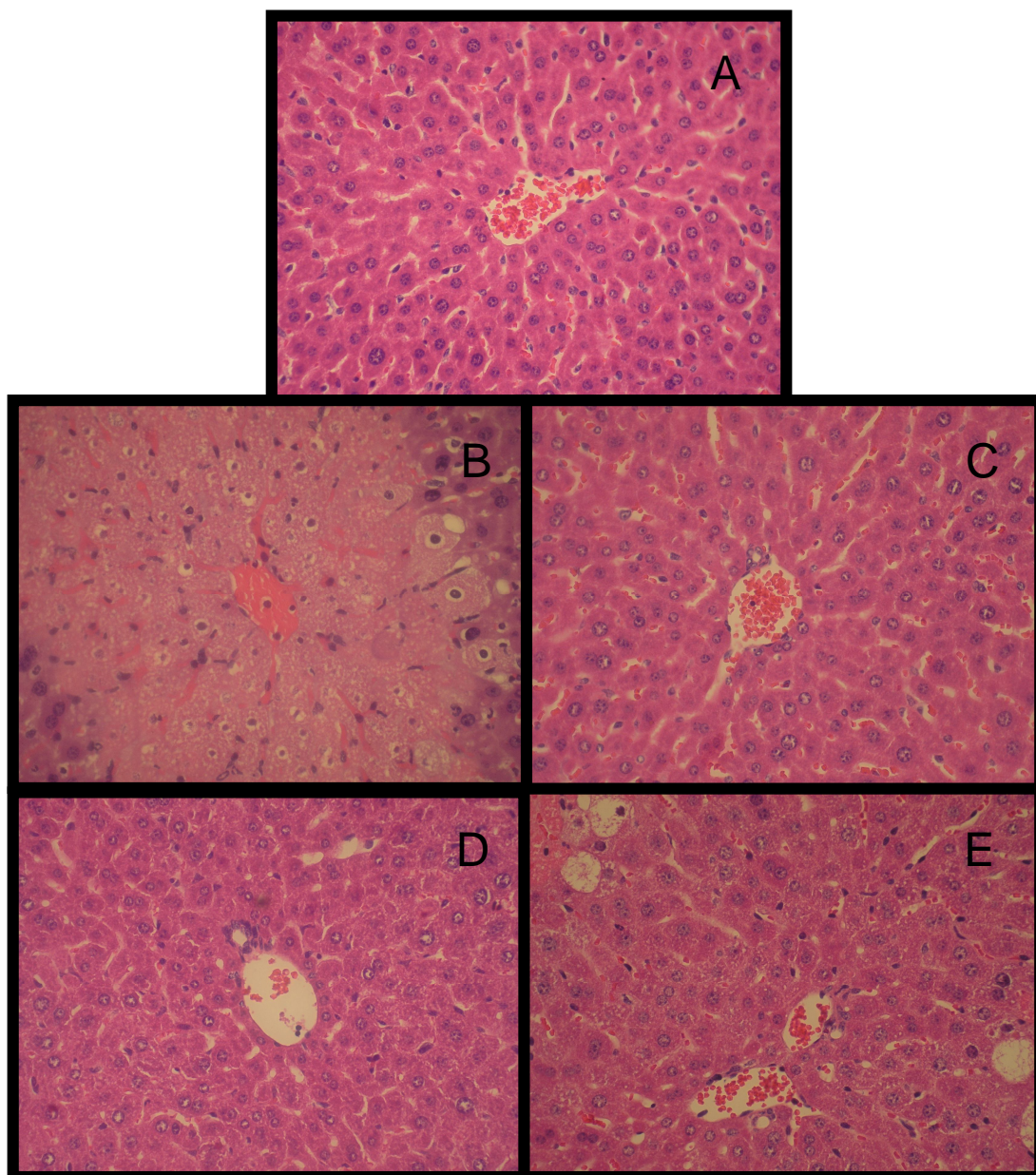


Figura 7: Microfotografias dos cortes histológicos do fígado dos ratinhos relativos aos diferentes tratamentos (hematoxilina e eosina (x400)). (A) Grupo de controlo negativo NaCl 0,9% mostrando uma veia central normal e arquitetura hepática típica; (B) Grupo de controlo positivo CCl₄ (1 ml/Kg) evidenciando a necrose centrolobular (C) Grupo IC (*Inula crithmoides*) (250 mg/Kg); (D) Grupo CCl₄ + IC (E) Grupo IC + CCl₄

Tabela II: Quadro demonstrativo das alterações histopatológicas hepáticas dos animais nos diferentes grupos.

<i>Fígado</i>	<i>NaCl</i>	<i>CCl₄</i>	<i>I. crithmoides</i>	<i>CCl₄ + IC</i>	<i>IC + CCl₄</i>
Necrose centrilobular	0	3	0	1	3
Focos hemorrágicos	1	4	0	2	3
Infiltrado inflamatório	0	2	0	1	1
Vacuolização dos hepatócitos	0	5	0	2	5
Desorganização dos sinusoides	0	5	0	2	4
Esteatose	0	4	0	1	4

0 - inexistentes; (1-2) leve; (3-4) moderado e (5) severo

4.2.2. Observação histológica do rim

Os rins dos ratinhos do controlo negativo (fig 4A e tabela III) apresentaram uma estrutura típica, nomeadamente a estrutura dos glomérulos e a perfeita distinção entre zona cortical e medular. Facto idêntico foi observado nos rins dos animais do grupo III, tratados com o extracto de *I. crithmoides*, (Fig 4C).

Nos animais injectados com uma dose única de CCl₄ (fig.4B), verificou-se uma desorganização na estrutura normal do rim, dilatação dos túbulos renais, modificação na estrutura dos glomérulos, hemorragias evidentes, processo inflamatório e degenerescência das células epiteliais. Nos grupos IV (fig. 4E) e V (fig. 4D) os rins apresentaram-se semelhantes ao grupo do CCl₄, no entanto, a hipertrofia tubular foi mais acentuada.

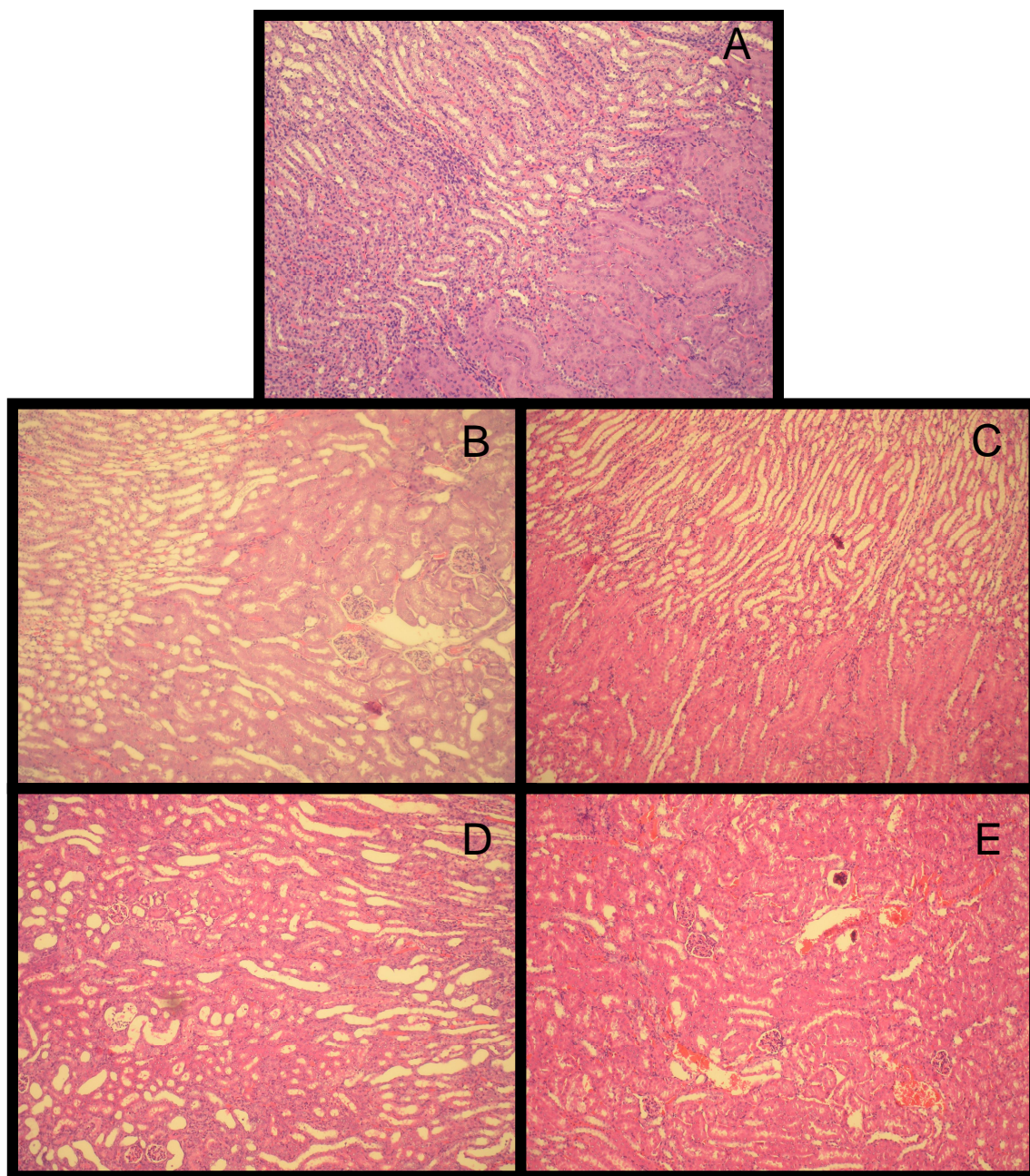


Figura 8: Microfotografias dos cortes histológicos do rim dos ratinhos relativos aos diferentes tratamentos (hematoxilina e eosina (x400). (A) Grupo de controlo negativo NaCl 0,9% (B) Grupo de controlo positivo CCl₄ (1 ml/Kg) (C) Grupo IC (*Inula crithmoides*) (250 mg/Kg); (D) Grupo CCl₄ + IC (E) Grupo IC + CCl₄

Tabela III: Quadro demonstrativo das alterações histopatológicas renais dos animais nos diferentes grupos.

<i>Rim</i>	<i>NaCl</i>	<i>CCl₄</i>	<i>I. crithmoides</i>	<i>CCl₄ + IC</i>	<i>IC + CCl₄</i>
Focos hemorrágicos	0	2	0	2	2
Hipertrofia tubular	0	3	0	4	4
Alterações glomerulares	0	2	0	2	2

0 - inexistentes; (1-2) leve; (3-4) moderado e (5) severo

4.2.3. Observação histológica do baço

Os resultados histológicos do baço e análise semi-quantitativa das referidas lesões são apresentados na Figura 5 e Tabela IV, respectivamente.

Os cortes histológicos do baço do grupo controlo NaCl (Fig. 5A) evidenciaram aspectos aparentemente normais, com uma distribuição normal entre a polpa branca e a polpa vermelha e ausência de hemorragias.

No caso dos animais injectados com o CCl₄ (fig.5B) observou-se hemorragia, desorganização das polpas vermelha e branca e presença de um maior número de linfócitos e macrófagos em relação ao controlo negativo.

No grupo III, exposto ao extracto de *I. crithmoides*, verificaram-se resultados semelhantes aos do controlo negativo, embora fosse evidente um maior número de linfócitos e macrófagos (Fig. 5C).

A análise histológica do baço de animais dos grupo IV (Fig. 5D) e grupo V (Fig.5E) revelaram ser semelhantes aos do grupo II, do controlo positivo, designadamente a presença de hemorragias, e hiperplasia da polpa vermelha, contudo, a presença de linfócitos e macrófagos foi mais acentuada.

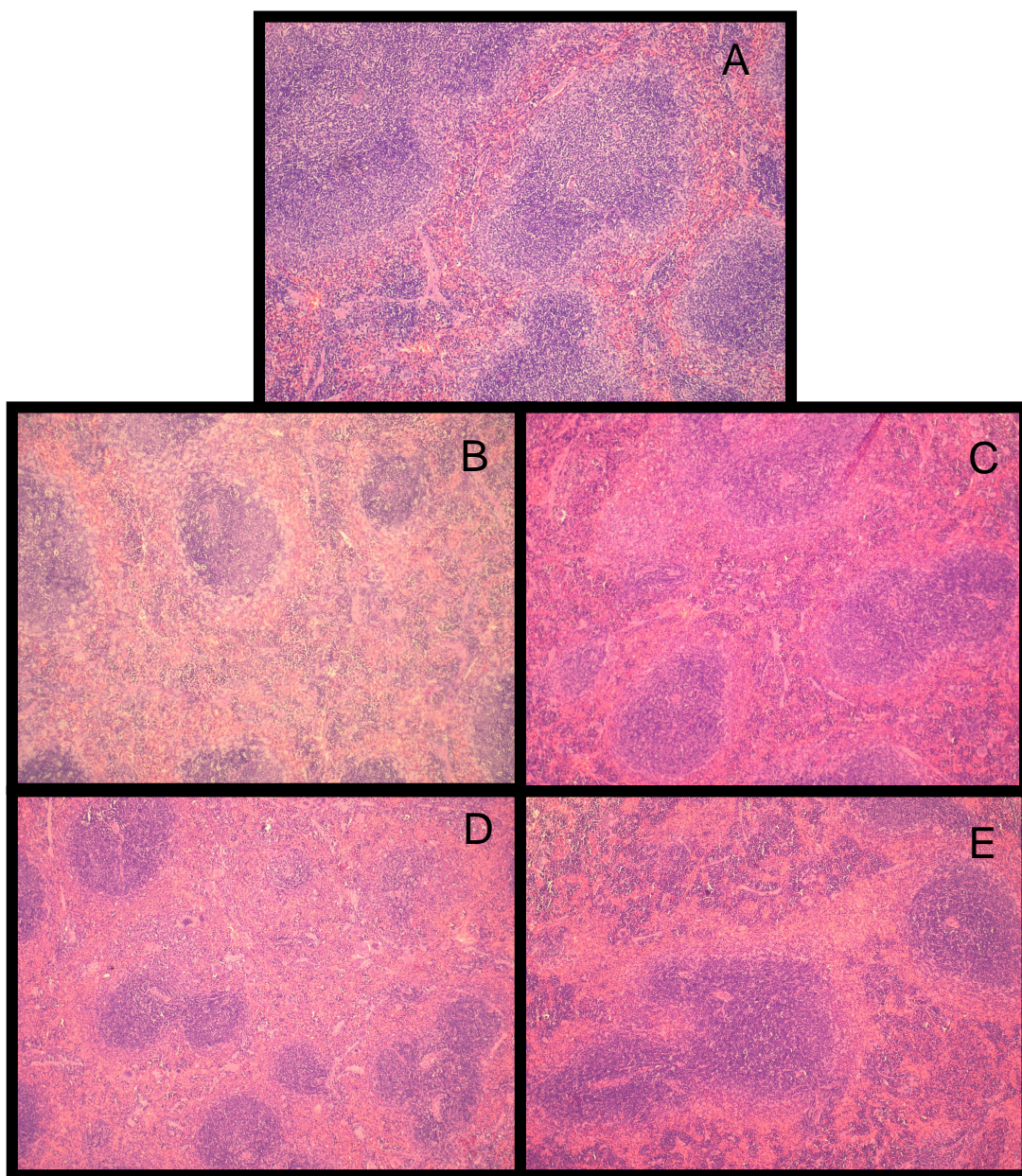


Figura 9: Microfotografias dos cortes histológicos do baço dos ratinhos relativos aos diferentes tratamentos (hematoxilina e eosina (x400)). (A) Grupo de controlo negativo NaCl 0,9%; (B) Grupo de controlo positivo CCl₄ (1 ml/Kg) ; (C) Grupo IC (*Inula crithmoides*) (250 mg/Kg); (D) Grupo CCl₄ + IC (E) Grupo IC + CCl₄

Tabela IV: Quadro demonstrativo das alterações histopatológicas do baço dos animais nos diferentes grupos.

<i>Baço</i>	<i>NaCl</i>	<i>CCl₄</i>	<i>I. crithmoides</i>	<i>CCl₄ + IC</i>	<i>IC + CCl₄</i>
Hiperplasia da Polpa Vermelha	0	2	1	2	2
Focos hemorrágicos	0	2	0	2	2
Aumento do número de linfócitos e macrófagos	0	1	0	3	2

0 - inexistentes; (1-2) leve; (3-4) moderado e (5) severo

4.3. Análise bioquímica

4.3.1. Transaminases séricas (ALT e AST)

Não são apresentados os resultados relativos ao controlo positivo pois apenas foi possível efectuar a análise sérica a um dos animais. Os resultados respeitantes às transaminases séricas são apresentados nas figuras 10 e 11.

Ao analisar os valores médios da ALT e AST nos diferentes grupos observa-se um aumento significativo destas enzimas no grupo V (IC + CCl₄) relativamente ao grupo controlo negativo.

É possível notar o total restabelecimento destas enzimas no grupo IV, tratado com o extracto de *I. crithmoides* após a injeção única com o CCl₄.

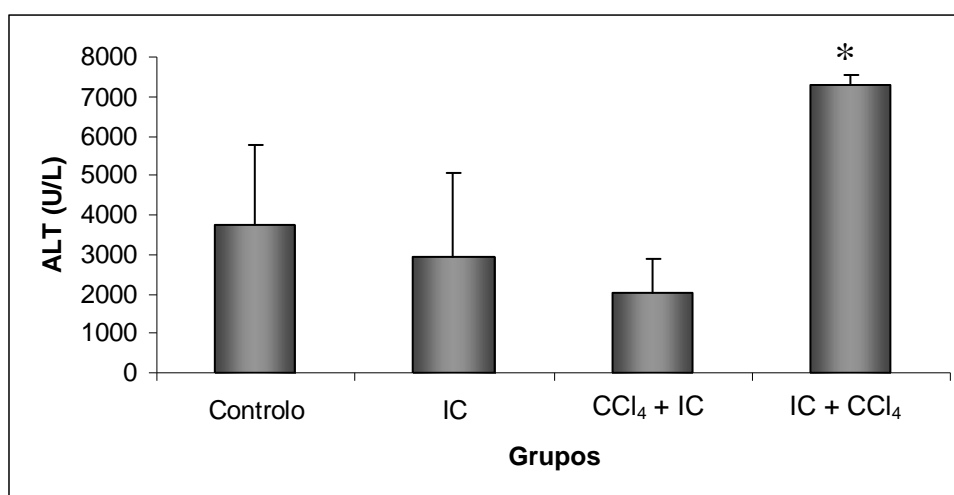


Figura 10: valores médios da ALT sérica dos vários grupos de tratamento

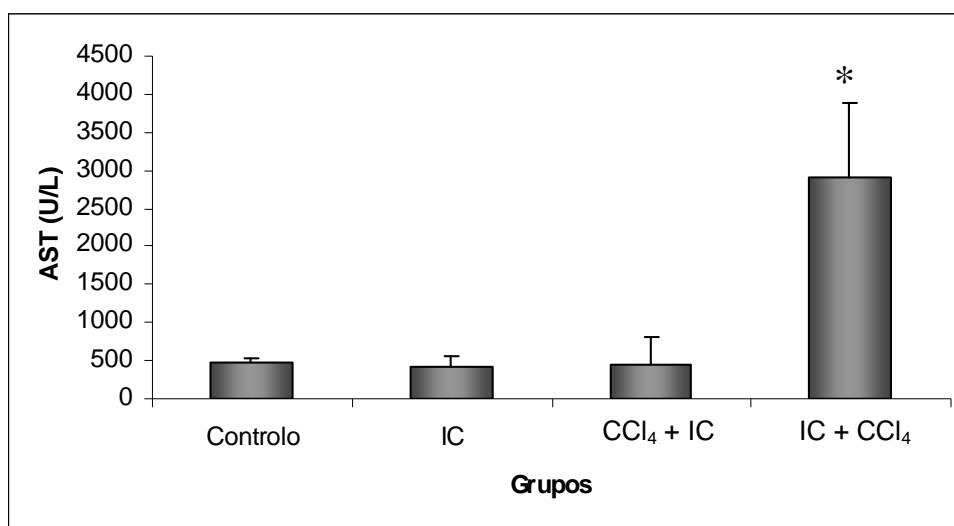


Figura 11: valores médios da AST sérica dos vários grupos de tratamento

4.3.2. Enzimas antioxidantes

4.3.2.1. Catalase (CAT)

Tal como foi referido, não foi possível determinar a actividade enzimática da catalase no grupo tratado com CCl₄, provavelmente, devido à necrose provocada por este tóxico, pelo que, apenas serão apresentados os resultados desta enzima nos restantes grupos.

Verificou-se que a actividade da catalase no fígado dos animais diminui de forma significativa, apenas no grupo IV (CCl₄ + IC) comparativamente ao controlo (NaCl) (Fig. 12).

Ao nível renal não se observou nenhuma alteração significativa na actividade desta enzima (Fig. 13).

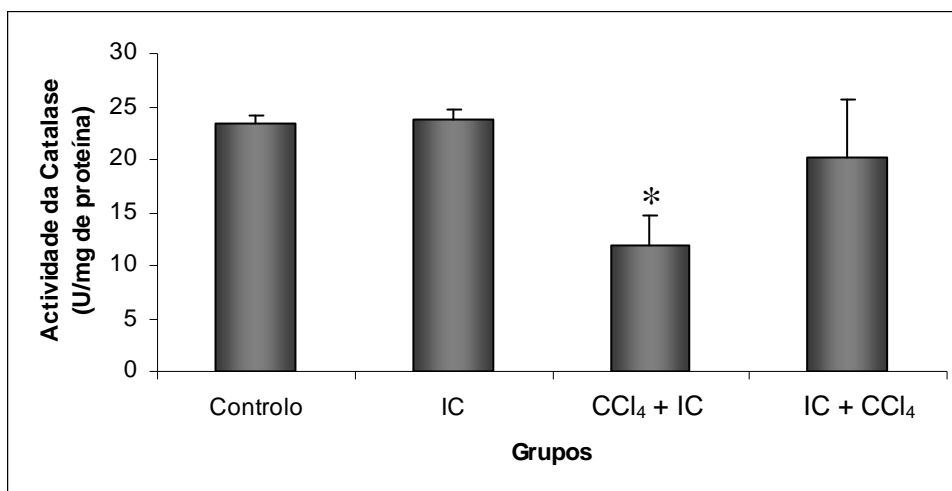


Figura 12: Efeito dos tratamentos na actividade da catalase nos fígados dos ratinhos. Os valores referem-se à média de 3 réplicas e as barras ao erro padrão.

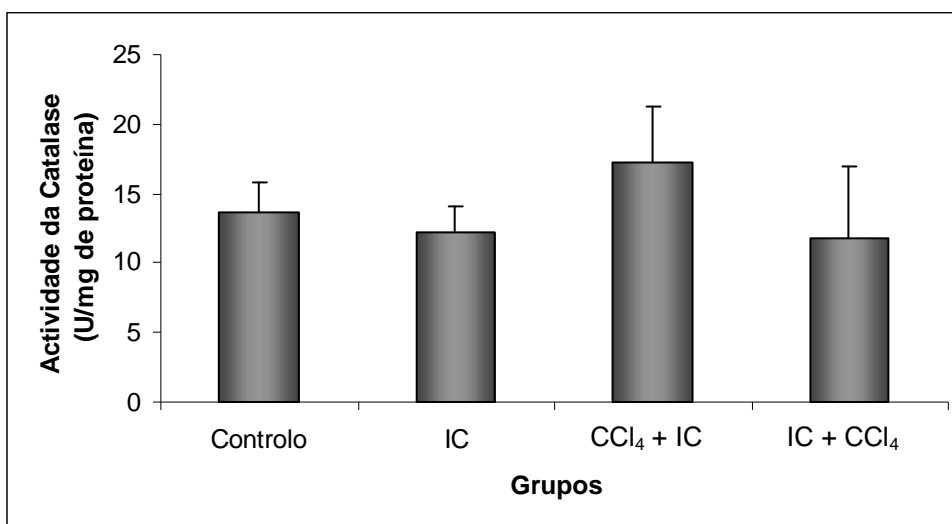


Figura 13: Efeito dos tratamentos na actividade da catalase no rim dos ratinhos. Os valores referem-se à média de 3 réplicas e as barras ao erro padrão.

4.3.2.2. Glutathione-s-transferase (GST)

Relativamente à GST, denota-se que a administração de CCl₄ aumentou significativamente a sua actividade no fígado dos ratinhos relativamente ao grupo controlo (Fig.14).

O extracto de *I. crithmoides*, quando administrado isoladamente também induziu o aumento da actividade da GST, embora não significativo. Nos grupos IV e V, designados

por CCl_4 + IC e IC + CCl_4 , os valores da actividade da GST foram idênticos aos da actividade observada nos tecidos dos animais controlo.

A nível renal notou-se que os diversos ensaios não induziram alterações significativas na actividade da GST (Fig.15). Verificou-se ainda que os valores da actividade desta enzima foram significativamente diferentes entre o fígado e rim, sendo menores neste último.

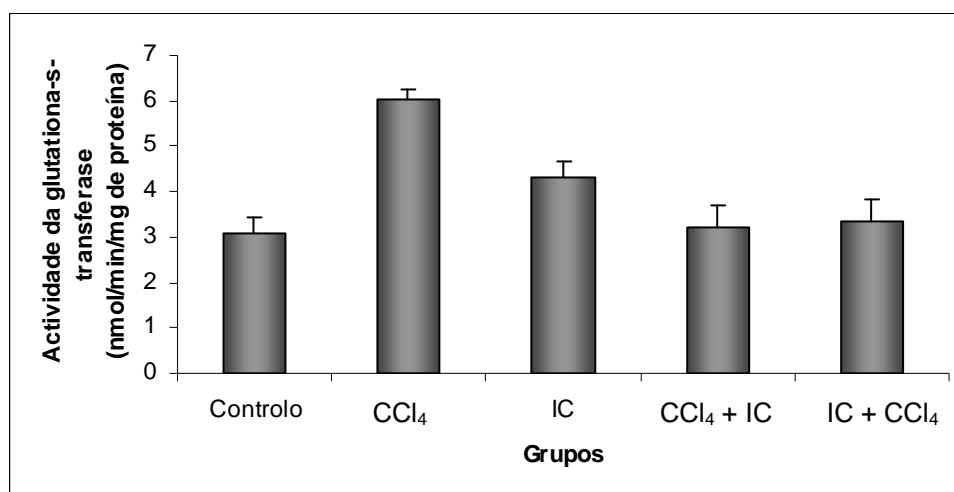


Figura 14: Efeito dos tratamentos na actividade da glutathione-S-transferase nos fígados dos ratinhos. Os valores referem-se à média de 3 réplicas e as barras ao erro padrão.

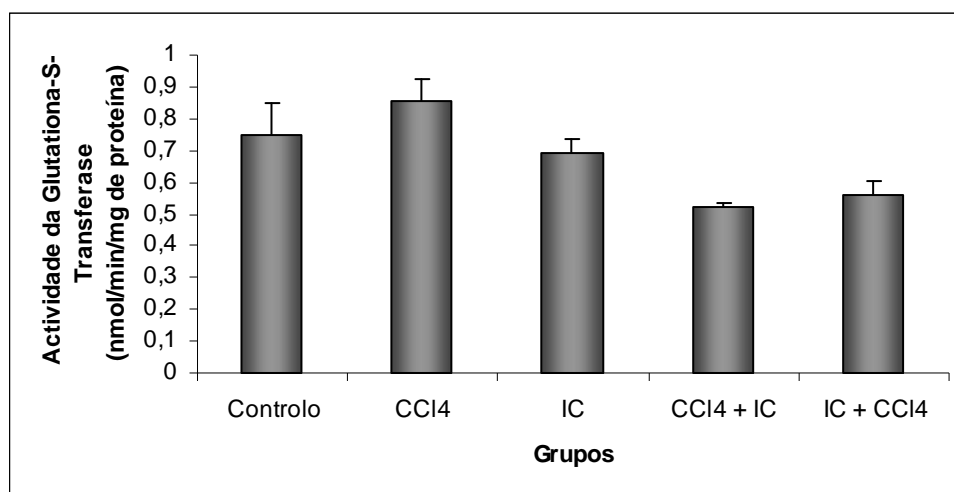


Figura 15: Efeito dos tratamentos na actividade da glutathione-S-transferase nos rins dos ratinhos. Os valores referem-se à média de 3 réplicas e as barras ao erro padrão.

4.3.2.3. Glutathione peroxidase (GPx)

Através da Fig. 16, pode observar-se que a actividade da GPx total aumentou nos grupos III, IV e V. No entanto, esta diferença não demonstrou ser significativamente pronunciada para excluir a hipótese de ser devida à própria variabilidade entre os animais.

No caso dos rins verificou-se que somente o grupo IV (CCl_4 + IC) foi capaz de induzir o aumento significativo da actividade da GPx total (Fig. 17).

Observou-se uma diferença significativa nos valores da actividade média da enzima nos dois órgãos.

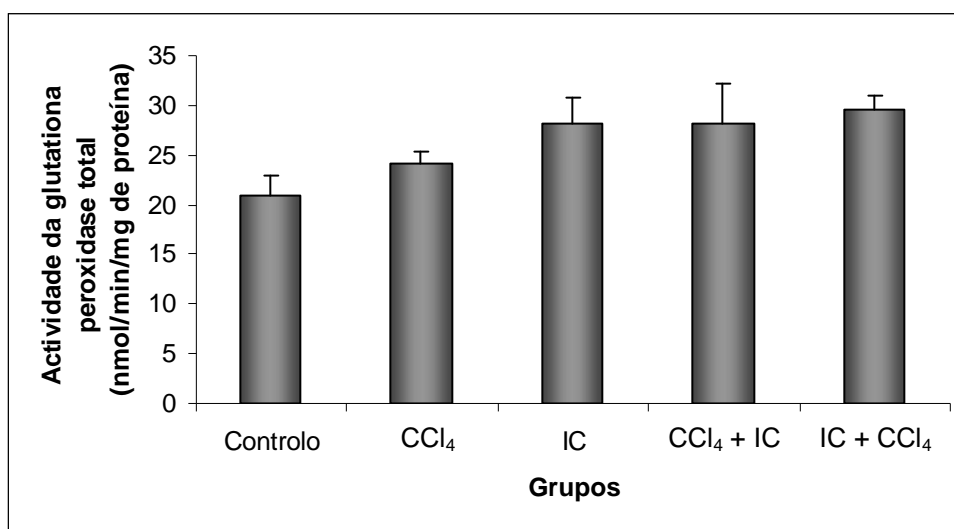


Figura 16: Efeito dos tratamentos na actividade da glutathione peroxidase total nos fígados dos ratinhos. Os valores referem-se à média de 3 réplicas e as barras ao erro padrão.

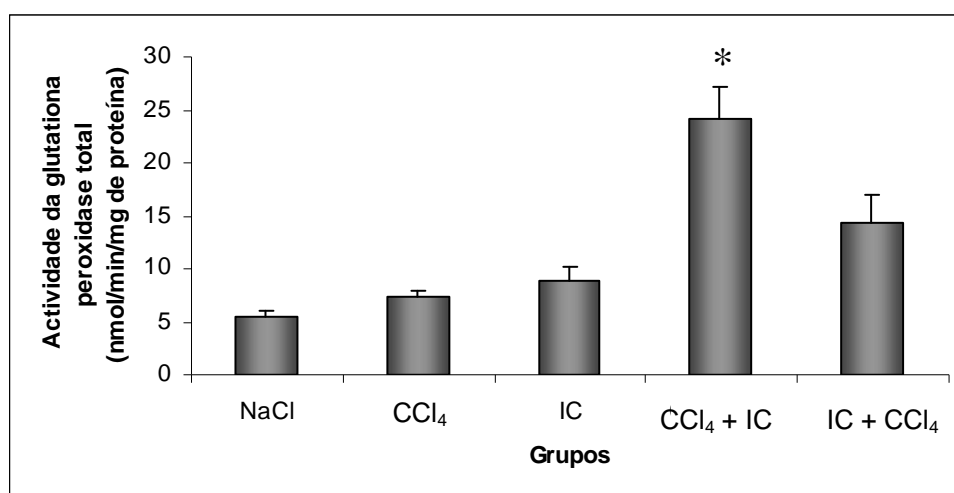


Figura 17: Efeito dos tratamentos na actividade da glutathione peroxidase total nos rins dos ratinhos. Os valores referem-se à média de 3 réplicas e as barras ao erro padrão.

A administração do CCl_4 aumentou significativamente a actividade média da GPx selénio-dependente no fígado (Fig. 18). No caso dos animais tratados com o extracto de *I. crithmoides* (grupo III), a actividade enzimática foi semelhante à observada para os animais do grupo controlo negativo, assim como o grupo IV (CCl_4 + IC).

A administração de CCl_4 , assim como do extracto de *I. crithmoides* não provocou uma diferença significativa na actividade enzimática nos rins (Fig.19), relativamente aos animais controlo. Apenas no tratamento IC + CCl_4 se observou um aumento muito significativo em relação aos restantes ensaios.

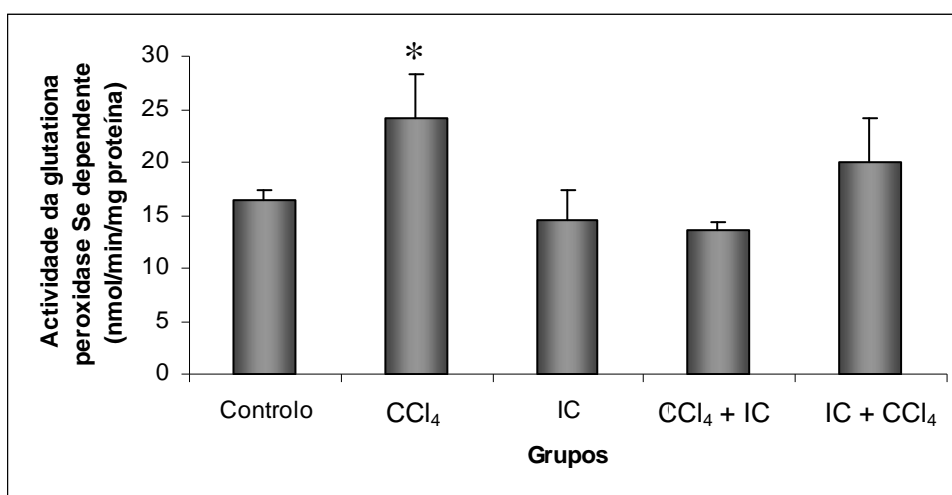


Figura 18: Efeito dos tratamentos na actividade da glutathione peroxidase selénio-dependente nos fígados dos ratinhos. Os valores referem-se à média de 3 réplicas e as barras ao erro padrão.

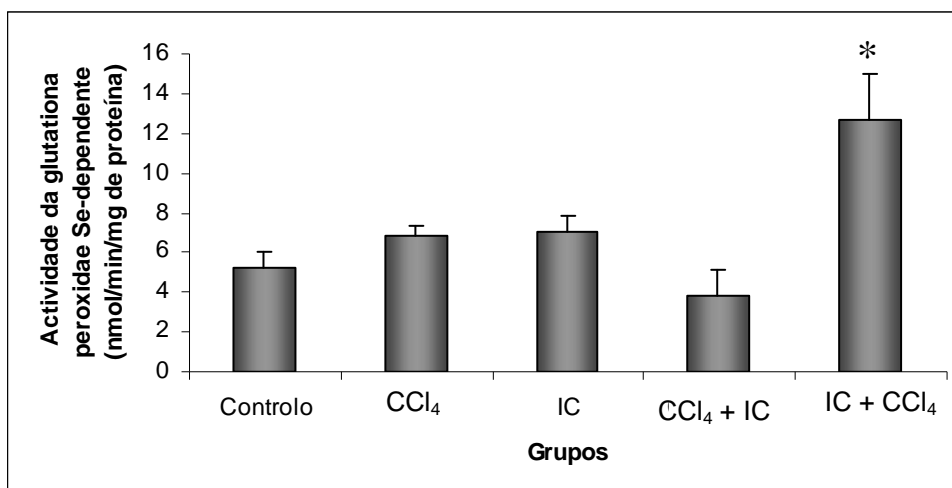


Figura 19: Efeito dos tratamentos na actividade da glutathione peroxidase selénio-dependente nos rins dos ratinhos. Os valores referem-se à média de 3 réplicas e as barras ao erro padrão.

5. DISCUSSÃO

No dia a dia, o ser humano está exposto a uma variedade de compostos hepatotóxicos, como por exemplo, no uso de tintas e seus derivados (2-nitropropano, 2-NP), outros reagentes químicos (tetracloro de carbono, CCl₄) e na exposição ao fumo do tabaco (2-NP). Portanto, torna-se pertinente a realização de estudos com vista ao desenvolvimento de novas terapias que previnam ou até mesmo revertam a toxicidade causada por estes compostos (Henry, 1999).

Os modelos animais para indução de lesão hepática são ferramentas importantes para o estudo da fisiopatologia e de possíveis tratamentos. Neste trabalho o CCl₄ foi o agente com acção hepatotóxica escolhido devido ao seu vasto e aprofundado conhecimento e à toxicidade específica que provoca. Por exemplo, a hepatotoxicidade induzida por uma dose única de CCl₄ é amplamente utilizado como modelo patológico das doenças hepáticas, dado que provoca lesão aguda com necrose centrolobular e esteatose (Recknagel, 1967; Weber et al., 2003).

A toxicidade do CCl₄ é devida à reacção das suas espécies radicalares, como o triclorometano e o radical peróxido do triclorometano, com lípidos e proteínas, causando peroxidação destes e oxidação das proteínas. Este facto pode conduzir à formação de radicais secundários e desencadeando assim uma série de reacções que podem levar à morte celular (Klaassen e Watkins, 2001). Além disso, alguns autores atribuem a sua toxicidade pelo aumento da geração de radical •OH na ausência da enzima catalase (Wang et al., 1998).

Relativamente ao peso corporal dos ratinhos verificou-se que o extracto aquoso de *I. crithmoides* não afectou o crescimento normal dos animais, mesmo aquando a administração anterior e posterior do CCl₄. No grupo administrado com o CCl₄, verificou-se um decréscimo significativo no peso médio dos animais.

Relativamente ao peso relativo dos órgãos (fígado, rins e baço), também não existiram diferenças nos diferentes grupos. Tal facto poderá indicar que a duração da experiência não foi suficiente para induzir tais alterações.

Através da análise histológica dos cortes de fígado verificou-se que os animais submetidos com uma dose única de CCl₄ apresentaram alterações histopatológicas como esteatose, necrose centrolobular e infiltração inflamatória. Porém não se detectou fibrose,

tal como descrito por Hall e colaboradores (1991). Também foram observadas alterações histopatológicas ao nível renal, nomeadamente a hipertrofia dos túbulos, ocorrência de focos hemorrágicos e alterações glomerulares. No baço, foi detectada uma notória hiperplasia da polpa vermelha, focos hemorrágicos e aumento do número de linfócitos e macrófagos.

Verificou-se que o extracto de *I. crithmoides* não causou qualquer alteração na morfologia hepática e renal. Relativamente ao baço, verificou-se apenas um aumento do número de linfócitos e macrófagos, sugerindo um aumento na actividade fagocitária.

No grupo IV (animais administrados com CCl₄ + IC), observou-se a reorganização da morfologia hepática, nomeadamente a diminuição da extensão dos focos hemorrágicos, redução da vacuolização nos hepatócitos e diminuição da necrose centrilobular. Apesar das melhorias evidentes, não se pode inferir que tal facto se deve apenas à administração prévia do extracto, uma vez que o próprio órgão possui uma grande capacidade de regeneração (Klaassen e Watkins, 2001).

No grupo V (IC + CCl₄) não se observaram diferenças significativas nas lesões provocadas pelo tóxico em nenhum dos órgãos. Os rins dos animais deste grupo, evidenciaram hipertrofia tubular mais acentuada, o que poderá indicar que a interacção do xenobiótico com o extracto poderá potenciar a toxicidade.

Vários estudos têm demonstrado que a administração simultânea de fármacos e flavonóides podem induzir alterações farmacocinéticas, conduzindo a um aumento da toxicidade ou ao declínio do efeito terapêutico (Rice-Evans *et al.*, 1996).

As análises de bioquímica clínica são testes importantes que permitem estimar o grau da lesão e disfunção hepática (Sherlock *et al.*, 2002) Para estabelecer um perfil bioquímico relacionado com a lesão provocada pelo CCl₄ nos ratinhos, seria ideal realizar o maior número de testes bioquímicos possível. Porém foram seleccionados apenas as transaminases (ALT e AST) em virtude do volume reduzido de sangue recolhido.

A escolha dos parâmetros bioquímicos (AST, ALT) foi baseada na sua relação com doenças hepáticas, dado que os níveis séricos de AST, e ALT aumentam quando ocorre lesão hepática (Diaz-Gill *et al.*, 1999; Kus *et al.*, 2004). Segundo Wang *et al.* (2004) e os seus colaboradores a administração de CCl₄, aumenta significativamente o nível de transaminases, reflectindo a extensão das lesões. Neste trabalho, ao compararmos os

valores médios de AST e ALT entre os tratamentos verificou-se que o CCl₄ provocou lesões hepáticas evidentes, traduzidas pelos níveis elevados destas enzimas.

O extracto aquoso de *I. crithmoides* atenuou o aumento do nível de AST e ALT, sugerindo uma possível capacidade de redução do dano hepático, protegendo assim contra a fragilidade da membrana e actuando na diminuição do nível de enzimas na circulação sanguínea (Sheweitta et al., 2001; Sivaprasad et al., 2004).

A análise do estudo das transaminases no presente estudo vem suportar os dados histológicos observados e confirmar a presença de lesão celular após a injeção do CCl₄.

Vários estudos comprovam o efeito hepatoprotector de extractos vegetais contra o stress oxidativo provocado pelo CCl₄, alterando o aumento dos níveis da lipoperoxidação e potenciando o decréscimo da actividade das enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST) (Jain *et al.*, 2008; Hsiao *et al.*, 2003; Wills e Asha, 2006).

Tal como foi referido anteriormente, não foi possível determinar a actividade enzimática da catalase no grupo II, tratado com CCl₄, possivelmente devido às fortes lesões ocorridas (necrose centrilobular extensa). Também as actividades enzimáticas das GSTs e GPx selénio dependente no fígado, aumentaram significativamente em relação ao grupo controlo. Estes resultados, que evidenciam uma resposta característica de stress oxidativo, associados aos resultados dos níveis das aminotransferases e da histologia, sugerem que o CCl₄ é um indutor de stress oxidativo.

Verificou-se que a actividade enzimática da catalase no fígado diminuiu significativamente no grupo IV (exposto ao CCl₄, seguido de extracto), o que pode indicar que os animais estariam em recuperação após o stress oxidativo induzido pelo tóxico. Todavia, os animais deste mesmo grupo mostraram um acentuado aumento da actividade da GPx total nos rins. De facto, nas observações histológicas são notórias e significativamente mais fortes as lesões observadas nos rins dos animais deste grupo, indicando um possível processo de eliminação por via renal.

No caso da actividade enzimática das GST determinada no fígado, constatou-se que os valores dos grupos IV e V (IC + CCl₄ e CCl₄ + IC) se encontram próximos dos valores observados no grupo controlo, o que poderá indicar que o extracto não promove a via de destoxificação por intermédio da conjugação com glutathione. No entanto, os resultados obtidos a partir das actividades das diferentes enzimas antioxidantes, não mostram ser

coerentes e conclusivos quanto à eventual actividade protectora antioxidante do extracto de *Inula crithmoides*. Observam-se actividades enzimáticas da GST no (fígado), GPx total e GPx selénio-dependente (rim) nos animais tratados com o extracto de *I.crithmoides* superiores às observadas no controlo (embora não significativas). Este facto poderá sugerir que o extracto possui uma actividade pró-oxidante, possivelmente devido à presença de flavonóides.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os dados histológicos do presente trabalho permitem concluir que o extracto aquoso de *Inula crithmoides*, na dose de 250 mg/Kg, não revelou toxicidade para os órgãos em estudo (fígado, rins e baço).

Através da análise histológica, pode inferir-se ainda que o extracto aquoso de *I. crithmoides* não revelou uma propriedade hepatoprotectora significativa nas condições experimentais consideradas (dose e tempo de administração). No entanto, a análise histopatológica aliada à análise bioquímica das ALT e AST poderá indicar um possível efeito hepatoregenerador por parte do extracto. Futuramente, a realização de ensaios toxicológicos com várias doses de extracto, assim como vários tempos de administração poderão elucidar estas questões.

Sugere-se que o extracto aquoso de *I. crithmoides* em determinadas enzimas tenha um efeito pró-oxidante. Estes resultados podem estar relacionados com outros factores, nomeadamente a presença de metais nesta planta.

Será importante ainda o conhecimento da avaliação fitoquímica do extracto, com vista a estabelecer correlações sobre a estrutura dos constituintes químicos *per se* com as actividades biológicas testadas.

Será ainda de considerar um estudos mais aprofundado do metabolismo do extrato de *I. crithmoides* visando elucidar os mecanismos de acção das moléculas bioativas presentes.

7. BIBLIOGRAFIA

Abdel-Wahhab, M. A., S. H. Abdel-Azim, and A. A. El-Nekeety (2008). *Inula crithmoides* extract protects against ochratoxin A-induced oxidative stress, clastogenic and mutagenic alterations in male rats. *Toxicon* 52 (4):566-573.

Aebi H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods Enzymology* 105:121-126.

Ali-Shtayeh, M. S., R. M. R. Yaghmour, Y. R. Faidi, K. Salem, and M. A. Al-Nuri (1998). Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of Ethnopharmacology* 60 (3):265-271.

Bai, N. S., C. S. Lai, K. He, Z. Zhou, L. Zhang, Z. Quan, N. Q. Zhu, Q. Y. Zheng, M. H. Pan, and C. T. Ho (2006). Sesquiterpene lactones from *Inula britannica* and their cytotoxic and apoptotic effects on human cancer cell lines. *Journal of Natural Products* 69 (4):531-535.

Basu, S. (2003). Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. *Toxicology* 189 (1-2):113-127.

Berry, M.N., A.M. Edwards, G.J. Barritt (1991). Isolated hepatocytes – preparation, properties and applications. In: Burdon, R.H., Knippenberg, P.H. (Eds.), *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

Boulos, L. (1983). Medicinal Plants of North Africa. *Reference Publications*, Inc, Algonac, Michigan, USA.

Boveris, A., S. Llesuy, L. A. Azzalis, L. Giavarotti, K. A. Simon, V. B. C. Junqueira, E. A. Porta, L. A. Videla, and E. A. Lissi (1997). In situ rat brain and liver spontaneous chemiluminescence after acute ethanol intake. *Toxicology Letters* 93 (1):23-28.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochemistry* 72: 248–254.

Burkitt, H. George (1996). Wheather's basic histopathology : a colour atlas and text. 3rd ed. New York : *Churchill Livingstone* 8:288.

Cadenas, E. (1997). Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors* 6 (4):391-397.

Cameron JR., W.A.E. Karunrate (1936). Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration. *Journal Pathology Bacteriology*.92:1-4.

Chaudiere, J., and R. Ferrari-Iliou (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology* 37 (9-10):949-962.

Cross, C. E., G. Valacchi, B. Shock, M. Wilson, S. Weber, J. Eiserich, A. Vliet (2002). Enviromental Oxidant Pollutant Effects on Biologic System. *Am. J.Respir. Crit. Care Med.* 166: 44-50.

Klaassen C.D e Watkins J.B, (2001) Casarett and Doull's toxicology : the basic science of poisons. 6th ed. New York

Desmet, V. J. (2001). Histopathology of cholestasis. In *Hepatobiliary Diseases: Cholestasis and Gallstones*, edited by M. Acalovschi and G. Paumgartner, 21-31.

Diaz-Gil, J. J., J. Munoz, A. Albillos, C. Rua, C. Machin, R. Garcia-Canero, R. M. Cereceda, M. C. Guijarro, C. Trilla, and P. Escartin (1999). Improvement in liver fibrosis, functionality and hemodynamics in CCl₄-cirrhotic rats after injection of the Liver Growth Factor. *Journal of Hepatology* 30 (6):1065-1072.

Flohé, L., and W. A. Gunzler (1984). Assays of glutathione-peroxidase. *Methods in Enzymology* 105:114-121.

Fraga, C. G. e Oteiza, I. O. (2002). Iron Toxicity and antioxidant nutrientes. *Toxicology* 180: 23-32.

Gholap, S., and A. Kar (2003). Effects of *Inula racemosa* root and *Gymnema sylvestre* leaf extracts in the regulation of corticosteroid induced diabetes mellitus: involvement of thyroid hormones. *Pharmazie* 58 (6):413-415.

Giordano, O.S., M. J. Pestchanker, E. Guerreiro, J. R. Saad, R. D. Enriz, A. M. Rodriguez, E. A. Jauregui, J. Guzman, A. O. M. Maria, and G. H. Wendel (1992). Struture activity relationship in the gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. *Journal of Medicinal Chemistry* 35 (13):2452-2458.

Habig, W.H., M.J. Pabst, W.B. Jakoby (1974). Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. 249 (22): 7130–7139.

Haddad, J. J. (2002). Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cellular Signalling* 14 (11):879-897.

Hall, P. D., J. L. Plummer, A. H. Ilsley, M. J. Ahern, P. L. Cmielewski, and R. A. Williams (1994). The pathology of Liver-injury induced by the chronic administration of alcohol and low-dose carbon-tetrachloride in porton rats. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 9 (3):250-256.

Halliwell, B., J.M. Gutteridge (1999). Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed. Oxford University Press, New York.

HSDB. 2000. Hazardous Substances Data Base. National Library of Medicine. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>

- Haschek, W.M., C. G. Rousseaux (1998). Fundamentals of toxicologic pathology. San Diego : *Academic Press*, 13:563
- Haussinger D. (1996). Physiological functions of the liver. In: Greger R & Windhorst U (Eds.), *Comprehensive Human Physiology: From Cellular Mechanisms to Integration*, Springer-Verlag, Berlin, 1369-1391.
- Havsteen, B. H (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* 96 (2-3):67-202.
- Henry, J.B. (1999). Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 9ed. *Saunders*. 200-280.
- Hodek, P., P. Trefil, and M. Stiborova (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions* 139 (1):1-21.
- Hogdson, E. and Levi, P.E. (1994). Introduction to Biochemical Toxicology. 2^a ed. *Appleton & Lange* Norwalk.
- Hsiao, G., M. Y. Shen, K. H. Lin, M. H. Lan, L. Y. Wu, D. S. Chou, C. H. Lin, C. H. Su, and J. R. Sheu (2003). Antioxidative and hepatoprotective effects of *Antrodia camphorata* extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (11):3302-3308.
- Iijima, K., H. Kiyohara, M. Tanaka, T. Matsumoto, J. C. Cyong, and H. Yamada (1995). Preventive effect of taraxasteryl acetate from *Inula britannica* subsp *japonica* on experimental hepatitis *in vivo*. *Planta Medica* 61 (1):50-53.
- Jain, A., M. Soni, L. Deb, S. P. Rout, V. B. Gupta, and K. L. Krishna (2008). Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic and aqueous extracts of *Momordica dioica* leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 115 (1):61-66.
- Jones, F. A. (1996). Herbs: useful plants. *Journal of the Royal Society of Medicine* 89 (12):717-719.
- Junqueira, L.C.U., e Carneiro J.(2008). Histologia básica. 11^a ed. *Editora Guanabara*, Rio de Janeiro
- Krikorian, A. D. (1984). Medicinal-plants of North-Africa-Boulos, L. *Economic Botany* 38 (2):266-267.
- Kobayashi T., Q. H.Song, H. Kitamura, J. C.Cyong (2002). *Phytotherapy. Research*,16:377-382.
- Kus, L., N. Colakoglu, H. Pekmez, D. Seckin, M. Ogeturk, and M. Sarsilmaz (2004). Protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Acta Histochemica* 106 (4):289-297.

- Lee, K. J., and H. G. Jeong (2002). Protective effect of *Platycodi radix* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology* 40 (4):517-525.
- Lewis D. F. V. (1996). Cytochromes P450: Structure, Function and mechanism. *Taylor & Francis*, London.
- Lima, C. F., M. Fernandes-Ferreira, e C. Pereira-Wilson (2007). Drinking of *Salvia officinalis* tea increases CCl₄-induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology* 45 (3):456-464.
- Loguercio, C., and A. Federico. (2003). Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radical Biology and Medicine* 34 (1):1-10.
- Maciel, M.A.M., A.C. Pinto, V.F.Veiga, (2002). Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quimica. Nova.* 25, 429-438.
- Miller A.L. (1998). Botanical influences on cardiovascular disease. *Altern Med Rev* 3: 422–431
- Miura, Y. H., I. Tomita, T. Watanabe, T. Hirayama, and S. Fukui (1998). Active oxygens generation by flavonoids. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 21 (2):93-96.
- Noctor, G., and C. H. Foyer (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49:249-279.
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63 (7):1035-1042.
- Plaa, G. L. 1997. A four-decade adventure in experimental liver injury. *Drug Metabolism Reviews* 29 (1-2):1-37.
- Plaa, G. L. 2000. Chlorinated methanes and liver injury: Highlights of the past 50 years. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 40:43-65.
- Proença da Cunha, A. Silva, O. Roque (2006). Plantas e Produtos vegetais em Fitoterapia, Fundação Calouste Gulbenkian.
- Rao K.S., S.H. Mishra (1997). Hepatoprotective activity of *Inula racemosa* root. *Fitoterapia* LXVIII: 510–514.
- Recknagel, R. O. (1967). Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacological Reviews* 19 (2):145-149.
- RiceEvans, C. A., N. J. Miller, and G. Paganga. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids (vol 20, pg 933, 1996). *Free Radical Biology and Medicine* 21 (3):417-417.

Saygi, S., B. Konuklugil, O. Kutsal, I. T. Uzbay, G. Deniz, and Z. Goren (2003). Assessment of therapeutic effect of *Inula heterolepsis* in alcoholic rats. *Phytotherapy Research* 17 (6):683-687.

Scandalios J. (1997). Molecular Genetics of Superoxido in Plants in Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses Edição de Scandalios J.. Cold Spring Harbor Laboratory Press: 527-565.

Selim, M.A., H.M. El-Hefnawy, T.A. Ibrahim, A.A. Sleem (2003). Flavonoids and antihepatotoxic activity of *Inula crithmoides* L. growing in Egypt. Egypt. *extenso J. Biomed. Sci.* 12: 83-95.

Seth SD, Maulik M, Katiyar CK, Maulik SK. (1998). Role of lipistat in protection against isoproterenol induced myocardial necrosis in rats: a biochemical and histopathological study. *Indian Journal Physiol Pharmacol* 42: 101-106.

Shan, J. J., M. Yang, and J. W. Ren (2006). Anti-diabetic and hypolipidemic effects of aqueous-extract from the flower of *Inula japonica* in alloxan-induced diabetic mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29 (3):455-459.

Sherlock, S e Dooley J. (2002). Diseases of The Liver and Biliary System.11^a ed. *Blackwell Publishing Ltd.*, 2:19-334.

Sheweita, S. A., M. Abd El-Gabar, and M. Bastawy (2001). Carbon tetrachloride-induced changes in the activity of phase II drug-metabolizing enzyme in the liver of male rats: role of antioxidants. *Toxicology* 165 (2-3):217-224.

Sivaprasad, R., M. Nagaraj, and P. Varalakshmi (2004). Combined efficacies of lipoic acid and 2,3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver. *Journal of Nutritional Biochemistry* 15 (1):18-23.

Song, Q. H., T. Kobayashi, K. Iijima, T. Hong, and J. C. Cyong (2000). Hepatoprotective effects of *Inula britannica* on hepatic injury in mice. *Phytotherapy Research* 14 (3):180-186.

Tan, R. X., H. Q. Tang, J. Hu, and B. Shuai (1998). Lignans and sesquiterpene lactones from *Artemisia sieversiana* and *Inula racemosa*. *Phytochemistry* 49 (1):157-161.

Telford, Ira R., C.F. Bridgman (1995). Introduction to functional histology. 2nd ed. London : Harper Collins 26: 574

Tieppo, M., M. Porawski, M. Salvador, A. J. Moreira, P. S. Collado, J. Gonzalez-Gallego, and N. P. Marroni (2006). *Croton cajucara* Benth. leaf extract scavenges the stable free radical DPPH and protects against oxidative stress induced by paraquat. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29 (1):161-165.

Timbrell, J.A.(1991). Principles of biochemical toxicology. 2^a ed.: *Taylor e Francis London*, Washington DC.

Tirkey, N., S. Pilkawl, A. Kuhad, K. Chopra (2005). Hesperidin, a citrus bioflavonoid, decreases the oxidative stress produced by carbon tetrachloride in rat liver and kidney. *extenso BMC Pharmacol.* v. 5, 2: 1-8.

Tiwari, A. K. (2001). Imbalance in antioxidant defence and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. *Current Science* 81 (9):1179-1187.

Tripathi YB and Chaturvedi P. (1995). Assessment of endocrine response of *Inula racemosa* in relation to glucose homeostasis in rats. *Indian Journal Exp Biology* 33:686–689.

Ulicna, O., M. Greksak, O. Vancova, L. Zlatos, S. Galbavy, P. Bozek, and M. Nakano (2003). Hepatoprotective effect of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) on CCl₄-induced liver damage in rats. *Physiological Research* 52 (4):461-466.

Vitaglione, P., F. Morisco, N. Caporaso, and V. Fogliano (2004). Dietary antioxidant compounds and liver health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44 (7-8):575-586.

Wang, B. J., C. T. Liu, C. Y. Tseng, C. P. Wu, and Z. R. Yu (2004). Hepatoprotective and antioxidant effects of *Bupleurum kaoi* Liu (Chao et Chuang) extract and its fractions fractionated using supercritical CO₂ on CCl₄-induced liver damage. *Food and Chemical Toxicology* 42 (4):609-617.

Wang Q., B. N. Zhou, R. W. Zhang, Y. Y. Lin, L. Z. Lin, R. R. Gil, and G. A. Cordell (1996). Cytotoxicity and NMR spectral assignments of ergolide and bigelovin. *Planta Medica* 62 (2):166-168.

Weber, L. W. D., M. Boll, and A. Stampfl (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical Reviews in Toxicology* 33 (2):105-136.

Wills, P. J., and V. V. Asha (2006). Protective effect of *Lygodium flexuosum* (L.) Sw. extract against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rat. *Journal of Ethnopharmacology* 108 (3):320-326.

Wingler, K., and R. Brigelius-Flohe (1999). Gastrointestinal glutathione peroxidase. *Biofactors* 10 (2-3):245-249.

Wollenweber, E., K. Mayer, and J. N. Roitman (1991). Exudate flavonoids of *Inula viscosa*. *Phytochemistry* 30 (7):2445-2446.